

UNIVERSITETET I OSLO

# **Studier i adenokarsinomceller fra bukspyttkjertel: Stimulering av cellemigrasjon og involverte signalveier**

---

Masteroppgave i farmakologi

**Furat Faiq Ibrahim**



**Oktober 2012**

**Farmakologisk Institutt, Det medisinske fakultet og Farmasøytisk Institutt, Avdeling for  
farmasøytisk biovitenskap, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet**

## FORORD

Master-oppgaven ble utført ved Farmakologisk institutt ved Rikshospitalet med eksternveileder professor Dagny Lise Sandnes og internveileder professor Hege Thoresen. Arbeidet med oppgaven foregikk i tidsrommet august 2011 til oktober 2012. Først og fremst vil jeg takke Gud for å ha gitt meg styrke til å fullføre dette studiet.

Jeg vil også takke Dagny for de mange faglige diskusjoner, lærerike samtaler, god hjelp, motiverende innspill, konstruktive tilbakemeldinger og kommentarer, som har gitt meg stor inspirasjon gjennom hele oppgaven, både under det praktiske og under skriveprosessen. Jeg vil også takke Eva Østby og Ingvild J. Brusevold for hjelp med det praktiske arbeidet.

En stor takk rettes til mine foreldre, Faiq Ibrahim Hamod og Sajedah Kahfi og til mine søsken, Haydar og Janan, som inspirerte, motiverte og støttet meg under hele studien. Deres støtte har vært avgjørende for at jeg har kommet meg gjennom farmasistudiet.

Sist men ikke minst vil jeg takke alle mine venner ved Universitetet i Oslo for morsom og minnerik studietid.

*Bærum, oktober 2012*

*Furat Faiq Ibrahim Al-yasiri*

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	1
<b>FORKORTELSER</b> .....	4
<b>SAMMENDRAG</b> .....	7
<b>1 INNLEDNING</b> .....	8
1.1 Kreft i bukspyttkjertelen .....	8
1.2 Cellemigrasjon .....	9
1.2.1 Skrape-analyse .....	9
1.2.2 Migrasjon gjennom en semipermeabel membran .....	10
1.3 Agonister og signalveier involvert i cellemigrasjon .....	11
1.3.1 G-proteinkoblede reseptorer (GPCR) .....	11
1.3.1.1 Cyklooksygenase-2 (COX-2) og PGE2 .....	13
1.3.1.2 Lysofosfatidinsyre (LPA) .....	13
1.3.1.3 Stroma-derivert faktor-1 (SDF-1).....	14
1.3.1.4 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat (TPA).....	15
1.3.2 Reseptor-tyrosinkinaser (RTK).....	16
1.3.2.1 HGF/Met-signalering .....	18
1.3.2.2 EGF/EGFR-signalering.....	18
1.3.3 Transaktivering av RTK .....	18
1.4 Bakgrunn for oppgaven .....	19
1.5 Hensikt med oppgaven .....	19
<b>2 MATERIALER</b> .....	20
2.1 Cellelinjer og medium .....	20
2.2 Kjemikalier .....	20
2.3 Løsninger .....	21
<b>3 METODER</b> .....	22
3.1 Dyrking av celler til de enkelte forsøk .....	22
3.2 Migrasjonsassay.....	22
3.2.1 Fargemetoden.....	22
3.2.2 Radioaktiv merking.....	23
3.3 Statistisk analyse av data .....	23

<b>4 RESULTATER</b>	25
4.1 Innledende forsøk	25
4.2 Farging versus radioaktiv merking	25
4.3 Effekt av ulike agonister på cellemigrasjon	27
4.3.1 Stimulering av migrasjon i AsPC-1-celler	27
4.3.2 Stimulering av migrasjon i HPAF-II-celler	29
4.3.3 Stimulering av migrasjon i Panc-1-celler	30
4.3.4 Stimulering av migrasjon i BxPC-3	31
4.3.5 Effekt av PGE2 i AsPC-1-celler	32
4.3.6 Effekt av PGE2 på migrasjon av HPAF-II-celler	33
4.3.7 Effekt av PGE2 i Panc-1-celler	34
4.4 Signalveier involvert i LPA-stimulert migrasjon i BxPC-3-celler	36
4.4.1 Betydning av ERK-signalveien	36
4.4.2 Betydning av protein kinase C	37
4.4.2.1 Effekt av PKC-hemmer på LPA-indusert migrasjon i BxPC-3-celler	37
4.4.2.2 Effekt av TPA på migrasjon i BxPC-3-celler	38
4.4.3 Betydning av Rho kinase	39
<b>5 DISKUSJON</b>	40
5.1 Metodologiske aspekter	40
5.1.1 Analysemetoden	40
5.1.2 Radioaktiv merking versus farging av cellene	42
5.2 Effekt av HGF og EGF på migrasjon i ulike bukspyttkjertelceller	43
5.3 Effekt av SDF-1 på stimulering av cellemigrasjon	45
5.4 Effekt av LPA på stimulering av migrasjon i de ulike cellelinjene	45
5.5 Effekt av PGE2 på migrasjon i ulike cellelinjer	46
5.6 Hemmer PGE2 effekten av LPA?	48
5.7 Signalveier involvert i LPA-stimulert migrasjon i BxPC-3-celler	48
<b>6 KONKLUSJON</b>	50
<b>7 REFERANSER</b>	51

## **FORKORTELSER**

AC	Adenylyl cyklase
ADAM	A disintegrin and a metalloproteinase
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosine-5'-trifosfat
ATX	Autotaxin
cAMP	Adenosin 3', 5' cyklisk monofosfat
COX	Cyklooksygenase
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPM	Desintegrasjoner per minutt
ECM	Ekstracellulært matriks
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGF(R)	Epidermal-vekstfaktor (reseptor)
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK (1/2)	Ekstracellulært signal regulert kinase (1 og 2)
EP	Prostaglandin E reseptor
FAK	Fokal adhesjon kinase
FBS	Føtalt bovint serum
Gab1	GRB2-assosiert binder
GDP	Guanosindifosfat
GF109203X	[2-[1-(3-dimetylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-maleimid]
GPCR	G-proteinkoblet reseptor
Grb	Vekstfaktorreseptor bindende
GRP	Gastrin releasing peptide

GTP	Guanosintrifosfat
HER/erbB	Human epidermal growth factor reseptor
HGF/SF	Hepatocytt-vekstfaktor/Scatter factor
HGFR/c-Met	Hepatocytt-vekstfaktor reseptor
IP3	Inositol (1,4,5)-trisfosfat
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KRAS	<u>K</u> irsten <u>r</u> at <u>s</u> arcoma viral oncogene homolog
LAF	Laminær air flow
LPA	Lysofosfatidinsyre
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MEK	MAPK kinase
MMP	Matriks metalloproteinase
Mrp4	Multidrug resistance protein 4
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
NSAID	Ikke-steroid antiinflammatorisk legemiddel
PBS	Fosfatbufret saltvann
PDK1	Fosfoinositid-avhengig proteinkinase 1
PD98059	2'-amino-3'-methoxyflavone
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PKA	Proteinkinase A
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Fosfolipase A <sub>2</sub>

PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PTX	Pertussis toksin
Raf	<u>r</u> apidly growing <u>f</u> ibrosarcomas
Rap1	<u>R</u> as- <u>p</u> roximate- <u>1</u> or <u>R</u> as- <u>r</u> elated protein <u>1</u>
Rho	<u>r</u> as <u>h</u> omologous
ROCK	Rho-assosiert protein kinase
RTK	Tyrosinkinase-reseptor
SDF-1/ CXCL12	Stroma-derivert faktor-1
SEM	Standard error of the mean
SH2/SH3 domene	Src homologi 2/3 domene
Sos	Son of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TPA	12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat
Y27632	<i>trans</i> -4-[(1 <i>R</i> )-1-aminoetyl]- <i>N</i> -4 pyridinylcykloheksankarboksamid

## SAMMENDRAG

Kreft i bukspyttkjertelen har dårlig prognose, og kjemoterapi har vist svært begrensede effekter ved metastaserende sykdom. Det er viktig å forstå molekylære mekanismer som regulerer cellemigrasjon og metastase, og som kan være aktuelle angrepspunkter for utvikling av nye legemidler. Legemidler som griper spesifikt inn i prosesser som styrer metastaseprosessen kan tenkes å gi en additiv effekt til kjemoterapi i behandlingsregimer for kreft i bukspyttkjertelen. Dyreeksperimentelle, epidemiologiske og kliniske studier har vist at et jevnlig inntak av COX-2-blokkere kan redusere risikoen for kreftutvikling. Målet med oppgaven var derfor primært å studere om prostaglandin E2 (PGE2) stimulerer migrasjon i fire cellelinjer isolert fra pasienter med adenokarsinom i pankreas, Panc-1, HPAF-II, AsPC-1 og BxPC-3. Som ledd i etablering av metoden ble også andre agonister, lysofosfatidinsyre (LPA), stroma-derivert faktor-1 (SDF-1), hepatocyt-vekstfaktor (HGF), epidermal-vekstfaktor (EGF) og 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat (TPA), studert. Noen av signalveiene som er involvert i migrasjon ble også klarlagt.

I denne oppgaven ble migrasjon gjennom semipermeabel membran benyttet som metode for å undersøke effekten av de ulike agonistene på migrasjon i cellelinjene. Stimulering med PGE2 i en konsentrasjon på  $10^{-4}$  M ga en signifikant stimulering av cellemigrasjon i Panc-1-celler. HGF-stimulering viste en signifikant økning i migrasjonsindeks i AsPC-1-celler. Resultatene viste også en signifikant økning i migrasjonsindeks i BxPC-3-celler ved stimulering med LPA og  $10^{-7}$  M TPA. For å undersøke hvilke mekanismer som er involvert i LPA-stimuleringen ble BxPC-3-cellene behandlet med PKC hemmer (GF109203X), MEK-hemmer (PD98059) og Rho kinase hemmer (Y27632). GF109203X blokkerte den induserte migrasjonen fullstendig, PD98059 ga en delvis blokkering og Y27632 viste ingen effekt på stimulert migrasjon. I tillegg ble det undersøkt om PGE2 hemmer LPA-stimulert migrasjon, men dette viste ingen effekt. Derimot var det en tendens til at PGE2 forsterket effekten av LPA.

Disse resultatene tyder på at effektene av de ulike agonistene er celletype-avhengig. Blokkering av LPA-effekten viser at PKC-signalveien er involvert i stimulering av migrasjon i BxPC-3-celler, og ERK-signalveien har også en rolle i stimuleringen.



# 1 INNLEDNING

## 1.1 Kreft i bukspyttkjertelen

Kreft utvikles gjennom opphopning av mutasjoner og genetiske skader som fører til aktivering av onkogener og inaktivering av tumorsuppressorgener. Det som kjennetegner kreft er brudd på de normale regulatoriske mekanismene som kontrollerer celleoverlevelse, proliferasjon, migrasjon, invasjon og interaksjon med naboceller og stroma. Nøkkelroller i kreftkjennetegnene er resistens mot apoptose, egen produksjon av vekststimulerende faktorer, manglende sensitivitet for veksthemmende faktorer, ubegrenset replikasjonsevne, vedvarende angiogenese og evnen til å metastasere [1].

Adenokarsinom i bukspyttkjertelen er en aggressiv sykdom som gir få symptomer, og ved diagnosetidspunkt har den ofte spredt seg. Mutasjoner i KRAS forekommer hyppig ved kreft i bukspyttkjertelen, og de fleste cellelinjene isolert fra pasienter har også mutasjoner i KRAS [2]. I følge Kreftregistret og Kreftforeningen øker risikoen for å utvikle bukspyttkjertelkreft med stigende alder, mest hos personer over 65 år. I 2009 var det 691 mennesker som fikk bukspyttkjertelkreft i Norge, likt fordelt på menn og kvinner. Kreft i bukspyttkjertelen utgjør 7.4 % av det totale antall dødsfall som skyldes kreft og er den femte vanligste årsaken til kreftdødsfall i vestlige land. Den står for kun 2,5 % av nye krefttilfeller i Norge, men utgjør den femte største årsak til kreftdødsfall. Prognosen er avhengig av sykdomsstadium, svulststørrelse og spredningsgrad til andre organer som lymfeknuter, lever og lignende. 80-99 % får tilbakefall etter fjerning av svulst ved operasjon. Den gjennomsnittlige overlevelsen etter diagnosen er 6 måneder og 5 års overlevelse er på 5 % [3].

Den eneste kurative behandlingsmetoden for kreft i bukspyttkjertelen er kirurgi, men dette gjelder når svulsten ligger i bukspyttkjertelens hodedel (Caput pancreatis) og ikke har spredt seg til andre organer. Dessverre oppdages sykdommen ofte så sent at operasjon med helbredende siktemål ikke er mulig. Både cellegiftbehandling og strålebehandling brukes for å lindre symptomer og gi bedre livskvalitet [4].

## **1.2 Cellemigrasjon**

Cellemigrasjon er definert som bevegelse av individuelle celler, celleplater og klynger fra et sted til et annet. Ved migrasjon dannes det en stor utvekst på den fremre delen, ”leading edge”, av en celle. Utveksten resulterer i en forlengelse av fremre del - og en sammentrekning av bakre del av cellen, som beveger seg i en spesifikk retning som respons på ulike miljøforandringer rundt cellen [5]. Migrasjon av celler spiller en avgjørende rolle i en rekke biologiske prosesser inkludert embryoutvikling, homeostase, immunreaksjoner, betennelser, cellevekst, differensiering, sårheling. Migrasjon kan dermed også bidra til noen patologiske prosesser som vaskulær sykdom, kroniske inflammatoriske sykdommer, tumordannelse og spredning av kreft [6].

Celleinvasjon refererer til 3-dimensjonal migrasjon av celler der de trenger gjennom en ekstracellulært matriks (ECM) og er en prosess som vanligvis er assosiert med metastasering av kreftceller [5, 7]. Det er utviklet mange analysemetoder for å studere disse prosessene in vitro.

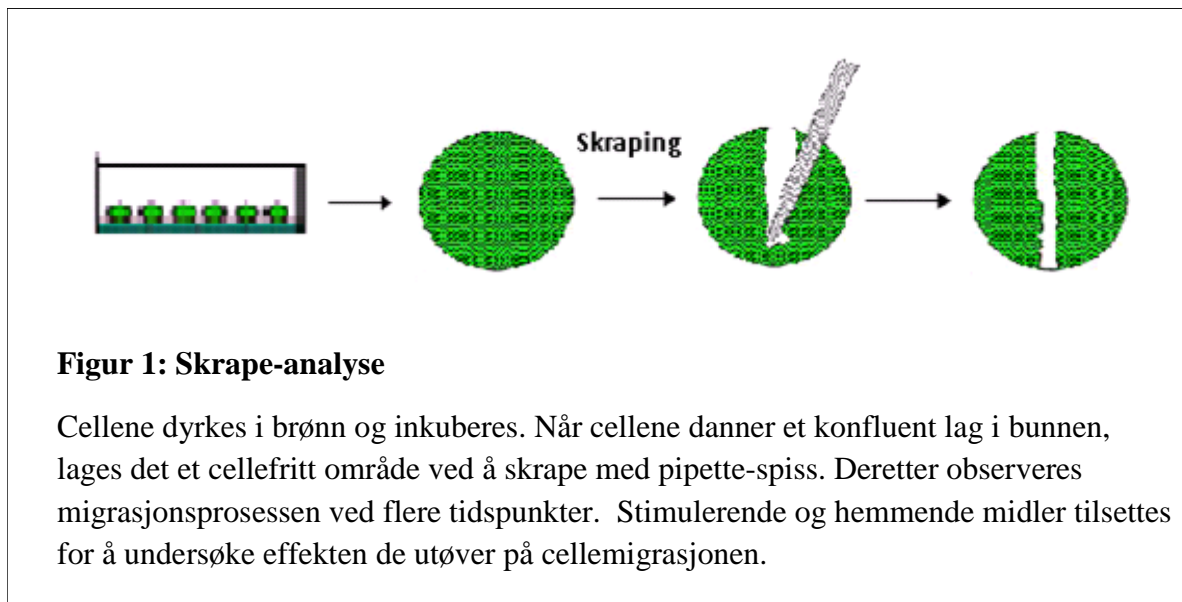
### **1.2.1 Skrape-analyse**

Skrape-analyse er en enkel, billig og godt etablert in vitro metode for å observere cellemigrasjon. Cellene dyrkes i brønner og inkuberes slik at cellene får feste seg til bunnen, spre seg og danne et konfluent lag. Deretter lages det et sår i cellelaget ved å skrape med pipette-spiss eller lignende på tvers av brønnen (figur 1). Hensikten med dette er å lage et cellefritt område og observere hvor raskt cellene beveger seg mot hverandre for å hele såret. Det tas bilder under mikroskop ved start og med jevne mellomrom under cellemigrasjonen. Ulike agonister og terapeutiske agens tilsettes brønnene for å undersøke stimulerende eller hemmende effekt på cellemigrasjonen.

Fordelen med metoden er at den etterligner cellemigrasjonen in vivo og i motsetning til migrasjon gjennom en membran, kan man observere celle-celle interaksjoner, og eventuelt celle-interaksjonen med ECM.

Det er få begrensninger og ulemper med denne metoden sammenlignet med andre metoder. Det benyttes ulike gjenstander for å lage sår i cellelaget, dermed kan sårstørrelse og form

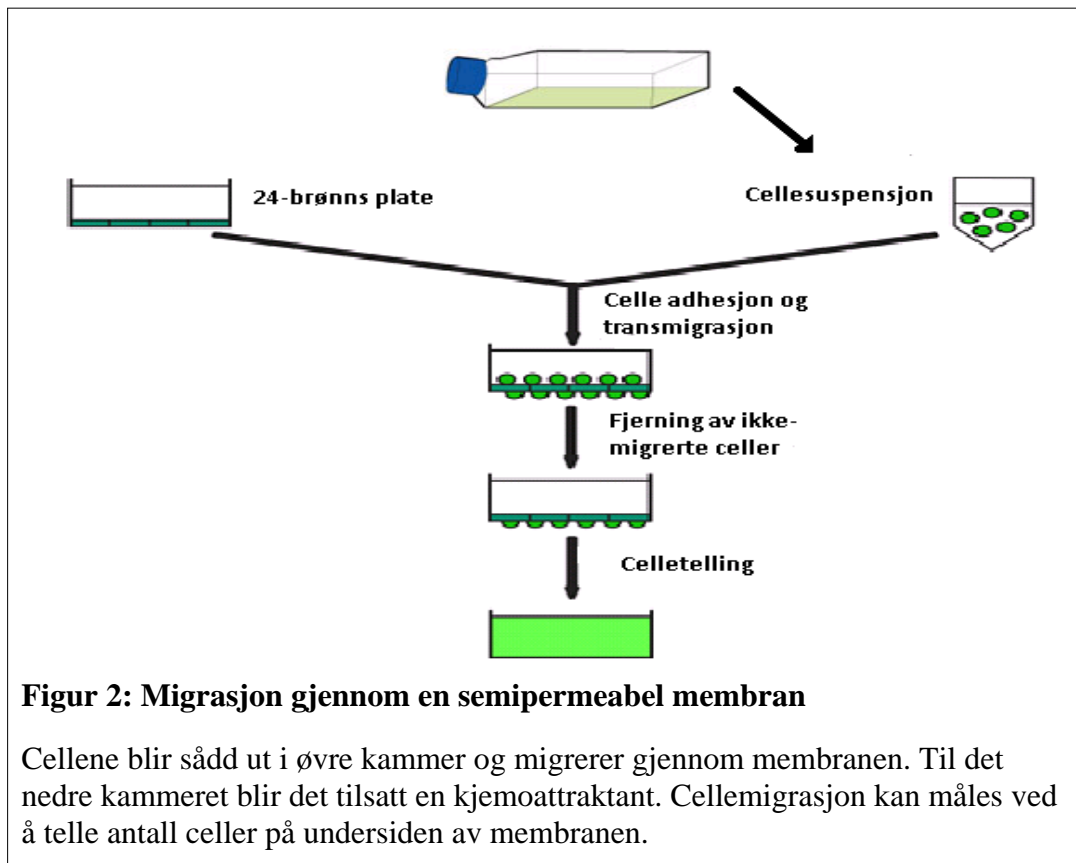
varierte fra forsøk til forsøk. Skrapingen kan også ødelegge den underliggende ECM og dermed påvirke resultatene. Det er derfor vanskelig å gjennomføre forsøkene under helt like forhold.



### 1.2.2 Migrasjon gjennom en semipermeabel membran

Metoden undersøker cellenes migrasjon in vitro som respons på ulike stoffer ved å bruke et kammer som plasseres i vanlige dyrkningsbrett. Kamrene har i bunnen en semipermeabel membran med 8 µm porestørrelse. Membranen består av polykarbonat eller andre materialer. Kamrene blir plassert i vanlige dyrkningsbrønner tilsatt medium med kjemoattraktant, mens cellene blir sådd ut i kamrene. Celler med migrerende egenskaper vil vandre gjennom porene i membranen mot kjemoattraktanten på undersiden av membranen (figur 2).

Etter en inkubasjonstid blir cellene telt. Antall celler som har migrert gjennom porene til undersiden av membranen som respons på kjemoattraktanten telles mikroskopisk. Ved å merke cellene på forhånd med et fluorescerende stoff eller med radioaktivitet kan mengde migrerte celler kvantiteres med spektrofluorometri eller scintillasjons-telling.

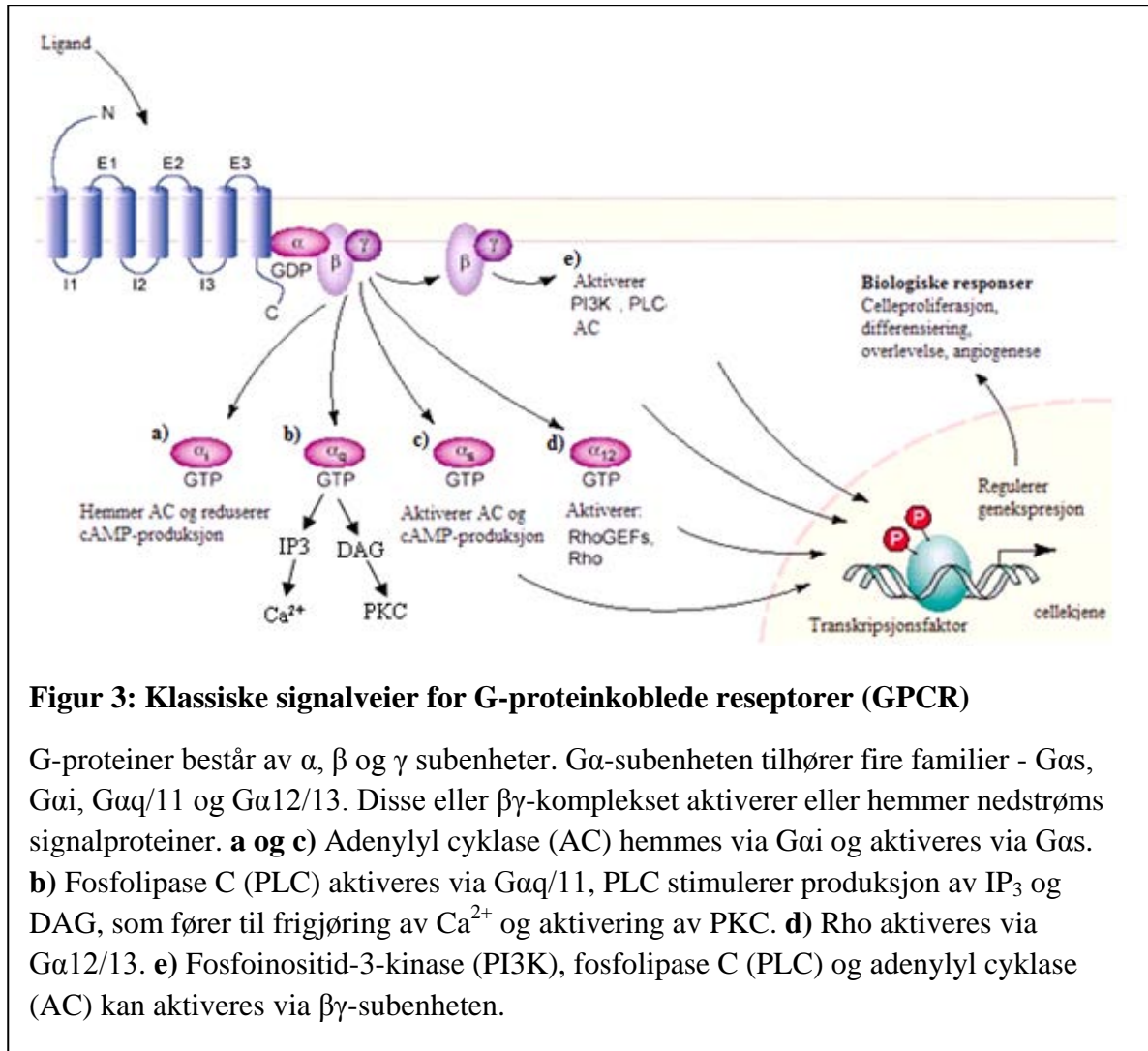


### 1.3 Agonister og signalveier involvert i cellemigrasjon

#### 1.3.1 G-proteinkoblede reseptorer (GPCR)

G-proteinkoblede reseptorer (GPCR) utgjør en stor familie av membranreseptorer. Disse består av syv  $\alpha$ -helikser som går gjennom cellemembranen med N-terminal ende vendt ut av cellemembranen, og C-terminal ende i cytosol. Den intracellulære delen er bundet til et G-protein som er ansvarlig for signaltransduksjon. Reseptoren kan dermed overføre ekstracellulære signaler til intracellulære signaler. G-proteinet består i sin inaktive tilstand av  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$  subenheter.  $G\alpha$ -subenheten tilhører fire familier -  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q/11$  og  $G\alpha_{12/13}$ . De er inaktive når de binder GDP og aktiveres av GTP. Reseptorene aktiveres blant annet av katekolaminer, hormoner og kjemokiner [8]. Ved ligandbinding skjer det konformasjonsendringer i reseptoren, og det tilknyttede G-proteinet aktiveres ved å utveksle GDP for GTP. Dette fører til redusert affinitet av  $G\alpha$  for  $G\beta\gamma$  og dermed dissosierer den GTP-bundne  $\alpha$ -subenheten fra  $\beta\gamma$  subenheten (figur 3).

Ulike agonister for GPCR som kjemokiner, trombin, lysofosfatidinsyre (LPA), gastrin-releasing peptide (GRP), endotelin og prostaglandiner regulerer mange celledfunksjoner, inkludert celledproliferasjon, overlevelse og motilitet, og har en sentral rolle i tumorvekst, angiogenese og metastase [1, 9-11].



Både  $\alpha$ - og  $\beta\gamma$ -subenhetene kan aktivere nedstrøms signalproteiner. Avhengig av hvilke reseptorer som er uttrykt i cellene, settes det i gang signalkaskader via cAMP, PI3K, PKA, PKC, PLC, Rho og Ras som fører til celledformendring, endret celledadhesjon og migrasjon [11-13]. Adenylyl cyclase (AC) hemmes via  $G_{\alpha i}$  og aktiveres via  $G_{\alpha s}$ . Fosfolipase C (PLC) aktiveres via  $G_{\alpha q/11}$ , og spalter membranfosfolipidet fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>) til diacylglycerol (DAG) og inositol (1,4,5) trisfosfat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> fører til frigjøring av  $Ca^{2+}$  fra det endoplasmatiske retikulum og DAG aktiverer protein kinase C (PKC). Rho aktiveres via

Gα12/13. Fosfoinositid 3-kinase (PI3K), fosfolipase C (PLC) og adenylyl cyklase (AC) kan aktiveres via βγ-subenheten (figur 3).

### **1.3.1.1 Cyklooksygenase-2 (COX-2) og PGE2**

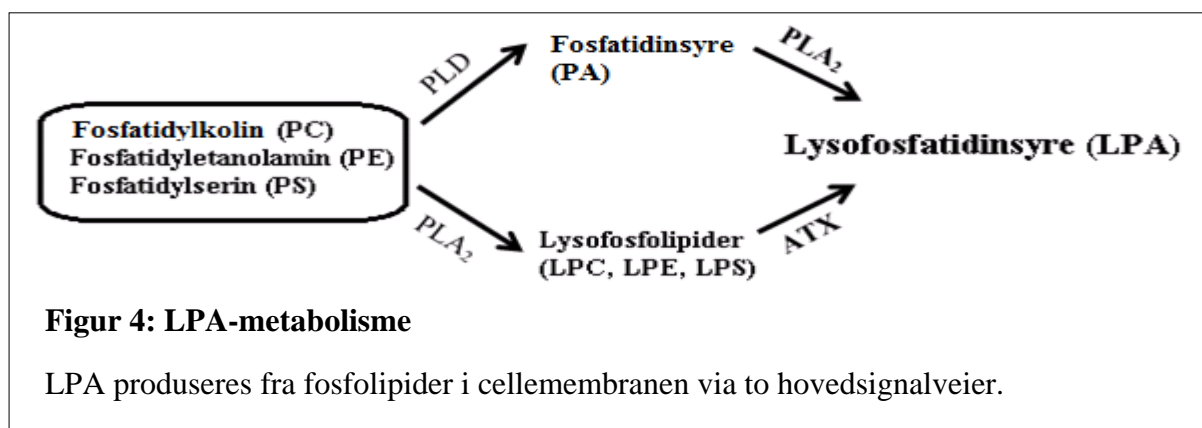
Cyklooksygenaser (COX) er enzymer som katalyserer omdanningen av arakidonsyre til eikosanoidene prostaglandiner, tromboksaner og leukotriener. To isoformer av cyklooksygenase er identifisert. Isoformen COX-1 er uttrykt konstitutivt i de fleste vev, mens COX-2 i de fleste vev ikke forekommer under fysiologiske forhold, men er oppregulert av cytokiner, vekstfaktorer og visse tumor-promoverende stoffer som for eksempel TPA, en forbolester. Prostaglandinene regulerer mange biologiske prosesser, som vasodilatasjon, hemming av blodplateaggregasjon, relaxering av glatt muskulatur i gastrointestinaltraktus, blodkar og livmor, og modifiserer utskillelse av hypotalamiske hormoner [13].

PGE2 medierer sine effekter via EP1, EP2, EP3 og EP4 reseptorer, som er G-proteinkoblede reseptorer. EP1 er antatt å være en Gαq-koblet reseptor som fremmer kalsium-mobilisering og PKC-aktivering, EP2 og EP4 er Gαs-koblet og stimulerer hovedsakelig cAMP-akkumulering, EP3 reseptoren er Gαi-koblet og vil i de fleste celler hemme cAMP-produksjon. De er også rapportert å kunne forsterke EP2/EP4-indusert cAMP-akkumulering i noen celler. Aktivisering av flere av disse reseptorene er også rapportert å kunne føre til transaktivering av EGF-reseptorer [8, 13].

In vitro og in vivo eksperimentelle studier har gitt holdepunkter for at NSAIDs kan forebygge kreft i bukspyttkjertelen [14]. Epidemiologiske studier har vist at NSAIDs beskytter mot utvikling av kreft i tykktarm og enkelte andre krefttyper, mens det ikke er en like klar sammenheng ved kreft i bukspyttkjertel [15-18].

### **1.3.1.2 Lysofosfatidinsyre (LPA)**

Lysofosfatidinsyre (i engelske litteratur forkortet LPA) er små glycerofosfolipider. LPA blir produsert via to signalveier: enten aktivisering av PLD fulgt PLA<sub>2</sub> eller aktivitet av PLA<sub>2</sub> og lysoPLD, også kalt autotaxin (ATX i figur 4). LPA regulerer mange biologiske prosesser.

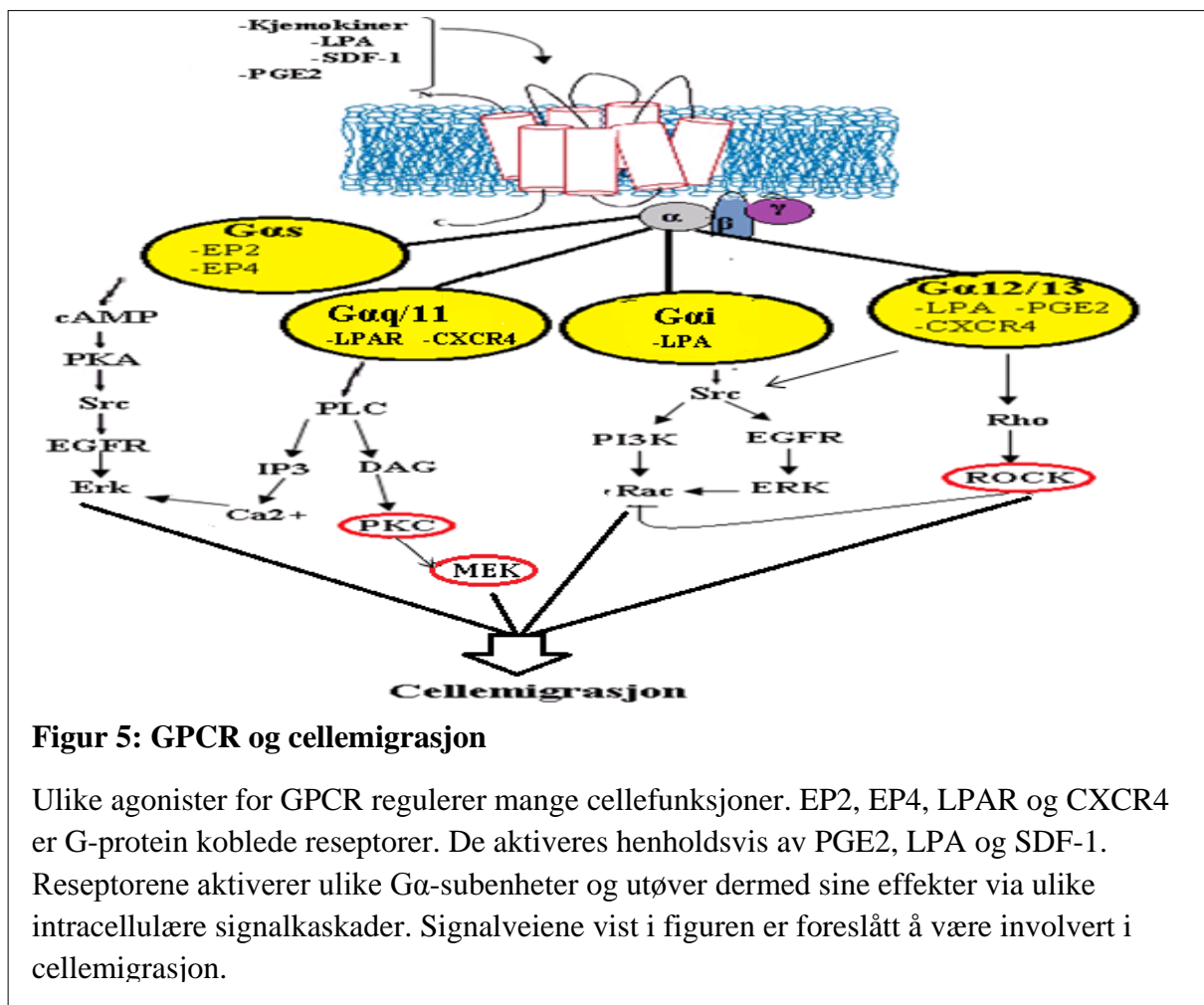


Det er klonet fem G-proteinkoblede reseptorer som binder LPA; LPA1, LPA2, LPA3, LPA4 og LPA5. Disse varierer i vevsdistribusjon og nedadgående signalveier. I bukspyttkjertel er LPA3 mest uttrykt og LPA1 og LPA2 finnes i moderate mengder. Disse tre reseptorene kan koble seg til  $G_{i/o}$ ,  $G_{\alpha q}$  og  $G_{\alpha 12/13}$  og føre til LPA-indusert PLC aktivering,  $Ca^{2+}$  mobilisering, AC hemming og aktivering, mitogen aktivert protein (MAP) kinase aktivering og aktivering av små GTPaser som Rac og RhoA (figur 5). Derfor er LPA-reseptorer og LPA-produserende enzymer interessante målmolekyler for behandling av nevropatisk smerte, nevropsykiatriske sykdommer, infertilitet, kardiovaskulære sykdommer, inflammasjon, fibrose og kreft [19].

### 1.3.1.3 Stroma-derivert faktor-1 (SDF-1)

Kjemokiner er cytokiner som virker som kjemoattraktanter og består av 60-80 aminosyrer. De inndeles i to grupper, CXC- og CC-kjemokiner. Stroma-derivert faktor-1 (SDF-1), også kalt CXCL12, tilhører CXC subfamilien og er ligand for den G-proteinkoblede CXCR4-reseptoren. SDF-1 er i motsetning til andre kjemokiner konstitutivt uttrykt i mange vev og spiller dermed en større rolle i å opprettholde immunforsvaret enn i inflammasjon. CXCR4 kan fremme angiogenese og fungere som vekstfaktor i svulsten, i tillegg til å stimulere migrasjon. Aktivering av disse reseptorene kan føre til ulike effekter, som kjemotakse, celleoverlevelse og/eller proliferasjon, økning i intracellulært kalsium, og gentranskripsjon [20]. CXCR4 utøver sine intracellulære effekter via  $G_{i/o}$ ,  $G_{\alpha q}$ - og  $\beta\gamma$ -subenhetene (figur 5). PKC-aktivering og videre aktivering av ERK1/2, mediert via  $\beta\gamma$ -subenheten er foreslått å mediere stimulering av cellemigrasjon [21, 22]. In vitro stimulering med SDF-1 $\alpha$  i duktale epitelceller fra mus resulterte i fosforylering av MAPK og AKT [23]. I ulike cellelinjer fra

kreft i bukspyttkjertelen er det påvist G $\alpha$ i-mediert transaktivering av EGF reseptor, med påfølgende ERK aktivering, som også synes avhengig av PI3K og Src [24].



**Figur 5: GPCR og cellemigrasjon**

Ulike agonister for GPCR regulerer mange celledfunksjoner. EP2, EP4, LPAR og CXCR4 er G-protein koblede reseptorer. De aktiveres henholdsvis av PGE2, LPA og SDF-1. Reseptorene aktiverer ulike G $\alpha$ -subenheter og utøver dermed sine effekter via ulike intracellulære signalkaskader. Signalveiene vist i figuren er foreslått å være involvert i cellemigrasjon.

### 1.3.1.4 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat (TPA)

12-O-tetradekanoylforbol-13-acetat (TPA) er en forbolester og er kjent som en potent tumorpromoter. TPA har en diacylglycerol-liknende struktur og kan erstatte diacylglycerol. Når cellene er stimulert under normale fysiologiske forhold, blir protein kinase C forbigående aktivert av diacylglycerol som produseres i membranen under signal-indusert omsetning av fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfat. Når TPA kommer inn i cellemembranen, kan den erstatte diacylglycerol og gi en vedvarende aktivering av protein kinase C, fulgt av nedregulering [25].

TPA er en potent aktivator av protein kinase C (PKC) og er involvert direkte eller indirekte i fosforylering av kjerne-proteiner som til slutt fører til aktivering av gentranskripsjon. Protein



kinase C (PKC) er en familie av serin/treonin-kinaser som regulerer en rekke cellulære prosesser som proliferasjon, apoptose, celleoverlevelse og migrasjon. Det er mange undersøkelser som knytter PKC til kreftutvikling, men dette synes å være PKC-isoenzym-avhengig og celletype-avhengig. Det er flere PKC-isoenzym-er som har vært beskrevet å være involvert i invasjon og metastasering av kreftceller, de molekylære mekanismene er fortsatt ufullstendig kjent [26-28].

### **1.3.2 Reseptor-tyrosinkinaser (RTK)**

Tyrosinkinase-reseptorer er store membranproteiner som består av en ekstracellulær del som binder ligand, en transmembran  $\alpha$ -heliks og et cytosolisk domene som har tyrosinkinase-aktivitet. Ved ligandbinding aktiveres reseptoren, og det fører til dimerisering og autofosforylering av reseptoren. RTK er reseptorer for mange vekstfaktorer, som epidermal vekstfaktor (EGF), hepatocyt-vekstfaktor (HGF), insulin og mange andre ligander. Ligandbinding til reseptoren aktiverer mange signaltransduksjonsveier som er involvert i regulering av celleproliferasjon, differensiering, cellemigrasjon og overlevelse [29-31].

Figur 6 viser en forenklet illustrasjon av hovedsignalmolekyler i RTK signalkaskader. I denne oppgaven fokuseres det på reseptoren for HGF, kalt Met- og EGF-reseptorene, fordi de er involvert i økt celleproliferasjon og invasivitet. Reseptorene aktiverer to intracellulære nedadgående hovedsignalveier, RAS-MAPK og PI3K-AKT. De vil i sin tur påvirke genekspresjon og cellyklusprogresjon i cellekjernen [29-31].

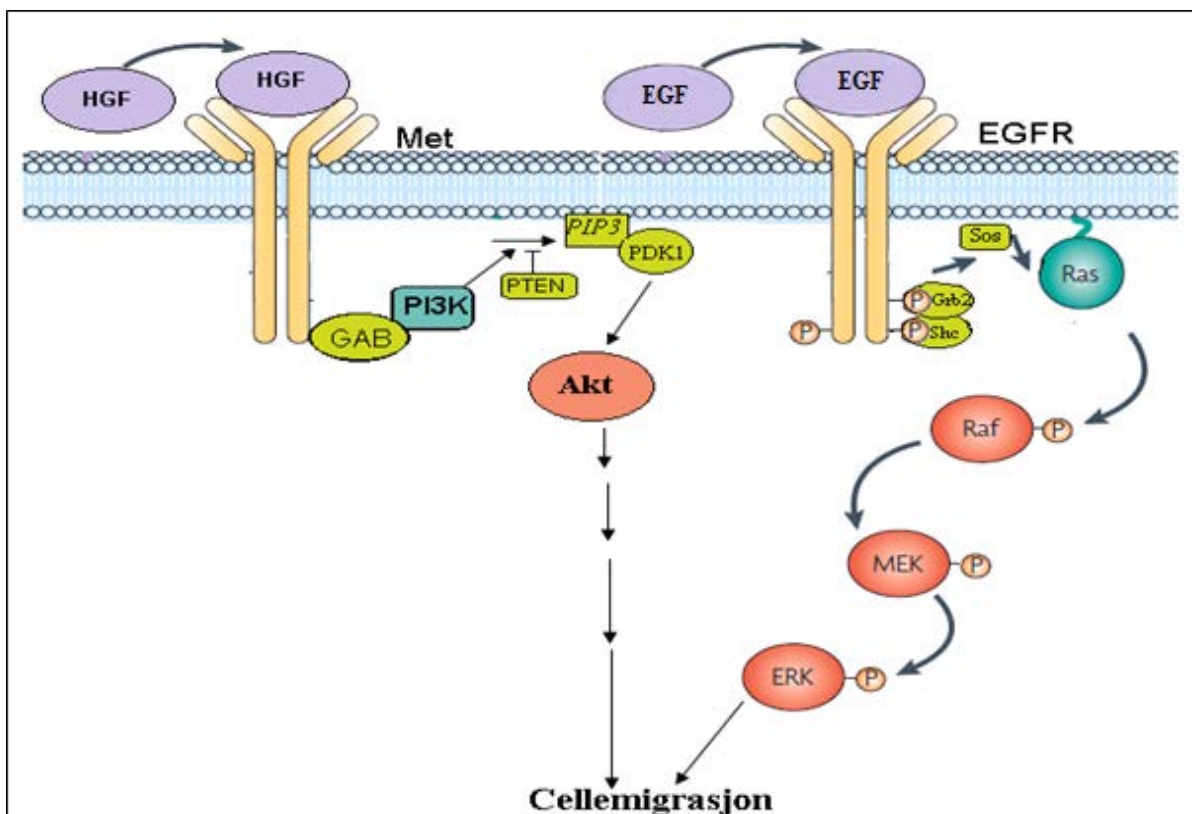
Signalveien starter ved at liganden binder seg til tyrosinkinase-reseptoren, noe som resulterer i autofosforylering og stimulering av tyrosinkinase-aktivitet. Fosforylerte tyrosinseter vil rekruttere intracellulære signalproteiner via deres Src-homologi 2 (SH2) domene. I tillegg vil SH2-inneholdende proteiner, som vekstfaktor-reseptorbindende protein-2 (Grb2), fungere som adaptorproteiner for å rekruttere andre signalproteiner til RTK. Disse signalproteinene er PLC, Ras, PI3K, FAK (focal adhesion kinase) og STAT. Proteinene blir fosforylert og aktivert [13].

Aktivert PLC vil hydrolysere sitt substrat PIP<sub>2</sub> til DAG og IP<sub>3</sub> som i sin tur aktiverer PKC og øker intracellulær konsentrasjon av kalsium.

Src-homologi 3 (SH3)-domenet til Grb2 binder seg til Sos (Son of sevenless), som fungerer som en aktivator av Ras. Grb2/Sos komplekset translokeres til plasmamembranen og binder

seg til Ras, som aktiveres ved utbytting av GDP med GTP, stimulert av Sos. GTP-bundet Ras rekrutterer Raf til plasmamembranen og Raf aktiveres. Aktivert Raf fosforylerer og aktiverer MAPK kinase (MEK) som igjen fosforylerer og aktiverer ekstracellulært-signalregulert proteinkinase (ERK). ERK translokerer til kjernen hvor den kan regulere genekspressjon ved fosforylering av transkripsjonsfaktorer [32].

I tillegg til Shc og Grb2 blir også Gab1 fosforylert på tyrosindomene. Fosforylert Gab1 bundet til reseptoren på plasmamembranen kan tiltrekke seg flere molekyler og enzymer som Src, PI3K og andre. PI3K fosforylerer membranbundne fosfoinositider, blant annet blir fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfat (PIP2) omdannet til fosfatidylinositol(3,4,5)-trisfosfat (PIP3). Fosfoinositid-avhengig protein kinase 1 (PDK1) er direkte bundet til PIP3. PDK1 i sin tur aktiverer Akt [33]. Akt kinase er også kjent som proteinkinase B (PKB). Den regulerer celleoverlevelse, vekst, spredning, angiogenese, metabolisme, og migrasjon [34].



**Figur 6: EGFR- og Met-signalveier**

EGFR og Met er reseptorer for vekstfaktorene epidermal-vekstfaktor (EGF) og hepatocyt-vekstfaktor (HGF). Begge aktiverer ERK og AKT. Disse signalveiene fører blant annet til økt cellemigrasjon.

### **1.3.2.1 HGF/Met-signalering**

Hepatocyt-vekstfaktor (HGF), også kalt scatter factor (SF) regulerer celleproliferasjon, migrasjon, overlevelse, angiogenese, og invasivitet. Den er kjent for å være et pleiotropisk cytokin som påvirker epitelceller i mange organer. HGF er ligand for c-Met/HGF-reseptoren, som er en reseptor-tyrosinkinase. Den er uttrykt i en rekke tumorceller, inkludert bukspyttkjertelceller [35].

### **1.3.2.2 EGF/EGFR-signalering**

EGF-reseptor er en av fire ErbB/HER reseptorproteiner (ErbB1, ErbB2, ErbB3 og ErbB4) som har lignende struktur og funksjon. Reseptoren er også kalt HER-1 eller c-erbB-1. ErbB-familien har 13 identifiserte ligander og ligandene aktiverer flere forskjellige reseptorer [36].

Det er vist at blokkering av EGFR hos mus med pankreaskreft reduserer tumorstørrelse og hindrer metastase til andre organer [37]. EGFR-aktivering spiller også en rolle i resistens mot kjemoterapi og strålebehandling i kreftceller. I løpet av de siste to tiårene har mye arbeid vært rettet mot å utvikle antistoffer og hemmere av tyrosinkinase som kan hemme EGFR aktivitet, og disse har fått klinisk anvendelse ved en rekke kreftsykdommer [38]. Erlotinib, som er en hemmer av EGFR tyrosinkinase, har gitt en beskjeden tilleggs-effekt når den kombineres med gemcitabin i behandling av pankreaskreft [39].

### **1.3.3 Transaktivering av RTK**

I tillegg til aktivering av de klassiske signalveiene, kan GPCR transaktivere EGFR eller andre RTK. Transaktivering av tyrosinkinase-reseptorer via GPCR er funnet å være involvert i kreftprogresjon og dannelse av metastaser [40]. Flere mekanismer for transaktivering er beskrevet, både intracellulære og ekstracellulære. I mange celler aktiverer GPCR matriks-metalloproteinaser (MMP og ADAM) som frigjør membranbundne ligander, slik at disse kan binde seg til, og aktivere EGFR. I andre celler aktiveres Src ved direkte binding til GPCR, til G $\alpha$ -subenhetene eller ved å danne komplekser med  $\beta$ -arrestiner. Src fosforylerer EGFR i det intracellulære domenet, og dette fører til aktivering [12].

$\beta$ -arrestiner er multifunksjonelle proteiner som rekrutteres til den intracellulære delen av GPCR. Binding hindrer videre aktivering av reseptoren sterisk, og bidrar dermed til å avslutte

signalet. I tillegg kan  $\beta$ -arrestiner også formidle G-protein-uavhengige signaler som aktivering av Src [41].

## **1.4 Bakgrunn for oppgaven**

Bukspyttkjertelkreft er en av de vanskeligste kreftformene å behandle og er den mest dødelige av de vanligste kreftformer.

Detaljert kunnskap om de molekylære signalveiene er viktig av to grunner: For det første kan viktige komponenter i disse signalveiene representere biomarkører som kan forutsi pasientens utfall mer pålitelig enn tradisjonelle morfologiske kriterier, og for det andre kan en detaljert forståelse av disse mekanismene bidra til å finne potensielle terapeutiske angrepspunkter for å hemme tumorvekst.

## **1.5 Hensikt med oppgaven**

Hensikten med oppgaven var å undersøke om ulike agonister som virker på GPCR eller RTK stimulerer migrasjon av cellelinjer isolert fra pasienter med adenokarsinom i pankreas. Videre var målet å undersøke hvilke signalveier som er involvert i prosessen. Dette kan bidra til å identifisere nye angrepspunkter for kreftbehandling.

## 2 MATERIALER

### 2.1 Cellelinjer og medium

Panc-1, AsPC-1, HPAFII og BxPC-3 er alle cellelinjer isolert fra pasienter med kreft i bukspyttkjertelen. Cellelinjene ble innkjøpt fra ATCC (Manassas, VA, USA) og var dyrket og frosset ned i flytende nitrogen. Cellene ble brukt i inntil 10 passasjer etter opptining.

AsPC-1- og BxPC-3-celler ble dyrket i RPMI-medium tilsatt ekstra glukose (endelig konsentrasjon 4,5 g/l), pyruvat (endelig konsentrasjon 1 mM) og glutamin (endelig konsentrasjon 2 mM), Panc-1-celler ble dyrket i DMEM tilsatt ekstra glukose (endelig konsentrasjon 4,5 g/l) og glutamin (4 mM). HPAF-II-celler ble dyrket i DMEM tilsatt glutamin (2 mM). Alle medier ble tilsatt Pen-Strep (10.000U/ml penicillin og 10,000 µg/ml streptomycin; 1 ml til 100 ml medium) og 10 % FBS. Cellene ble splittet en gang per uke, og medium ble byttet en gang mellom hver splitting.

### 2.2 Kjemikalier

- Føtalt bovint serum (FBS) fra Gibco.
- Trypsin-EDTA-løsning (170,000 U/l trypsin, 200 mg/l EDTA) ble kjøpt fra Lonza (Verviers, Belgia)
- Epidermal-vekstfaktor (EGF), GF109203X ([2-[1-(3-dimetylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-maleimid], 12-O-tetradekanoylphorbol-13-acetat (TPA), LPA (1-oleoyl-sn-glycerol 3-fosfat natriumsalt), natriumpyruvat (100 mM), glukose (450 mg/ml), dimetylsulfoksid (DMSO) og Accustain® ble kjøpt fra Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, USA). Rekombinant human HGF ble på et tidspunkt kjøpt fra Sigma, men denne viste seg å være mindre aktivt enn den som ble kjøpt fra Calbiochem.
- PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone) og rekombinant human HGF (hepatocytte-vekstfaktor) var fra Calbiochem (San Diego, CA, USA).
- Y27632 dihydroklorid (*trans*-4-[(1*R*)-1-aminoetyl]-*N*-4 pyridinylcykloheksanokarboksamid dihydroklorid) ble kjøpt fra Tocris Bioscience (Bristol, England).
- Prostaglandin E2 var fra Cayman Chemical Co (Ann Arbor, MI, USA)
- Rekombinant human SDF-1/CXCL-12 var fra R&D Systems Europe (Abingdon, England).

- $[6\text{-}^3\text{H}]$  thymidin (17 Ci/mmol) var fra PerkinElmer (Boston, MA, USA).

## 2.3 Løsninger

- EGF stock-løsning  $5 \times 10^{-6}$  M ble fortynnet i NaCl til  $1 \times 10^{-6}$  M, og videre fortynnet i serumfritt medium til en endelig konsentrasjon på  $1 \times 10^{-8}$  M.
- HGF stock-løsning ble løst i PBS til 2  $\mu\text{g/ml}$  eller 4  $\mu\text{g/ml}$  og frosset ved  $-80^\circ\text{C}$ . Ved bruk ble den fortynnet i serumfritt medium til endelig konsentrasjon 40 ng/ml.
- PGE2 stock- løsning med konsentrasjon  $10^{-1}$  M ble laget i etanol og frosset ved  $-20^\circ\text{C}$  i alikvoter på 10  $\mu\text{l}$ . Ved bruk ble etanol fjernet under en strøm av nitrogengass, og PGE2 ble løst i 1 %  $\text{NaHCO}_3$  til  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  og  $10^{-5}$  M. Videre ble disse løsningene fortynnet med serumfritt medium til endelige konsentrasjoner  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  og  $10^{-7}$  M som ble brukt i forsøkene.
- LPA stock-løsning med konsentrasjon  $10^{-2}$  M ble laget i PBS og frosset ved  $-20^\circ\text{C}$  i alikvoter på 10  $\mu\text{l}$  og 20  $\mu\text{l}$ . Ved bruk ble løsningen fortynnet med serumfritt medium til endelig konsentrasjon  $10^{-5}$  M.
- SDF-1 stock-løsning med konsentrasjon 100  $\mu\text{g/ml}$  ble fortynnet med serumfritt medium til endelig konsentrasjon 100 ng/ml.
- PD98059 stock-løsning i DMSO med konsentrasjon  $5 \times 10^{-2}$  M ble fortynnet med DMSO til  $5 \times 10^{-3}$  M. Denne ble fortynnet med serumfritt medium til endelig konsentrasjon 25  $\mu\text{M}$ . Konsentrasjonen av DMSO ble 0,5 %, og kontrollene ble tilsatt samme konsentrasjon DMSO.
- GF109203X stock-løsning i DMSO med konsentrasjon  $10^{-2}$  M ble fortynnet med DMSO til  $2 \times 10^{-3}$  M. Denne ble fortynnet videre i serumfritt medium til endelig konsentrasjon 10  $\mu\text{M}$ . Konsentrasjonen av DMSO i den endelige fortynningen var 0,5 %, og kontrollene ble tilsatt samme konsentrasjon DMSO.
- TPA stock-løsning i DMSO med konsentrasjon  $2 \times 10^{-3}$  M ble fortynnet med DMSO og 0,9 % NaCl til  $10^{-4}$  M. Videre fortynninger til  $10^{-5}$  og  $10^{-6}$  M ble gjort med 50 % DMSO. Bruksferdige løsninger ble fortynnet i serumfritt medium til  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  og  $10^{-8}$  M. Konsentrasjonen av DMSO i de endelige fortynningene var 0,5 %, og kontrollene ble tilsatt samme konsentrasjon av DMSO.
- Y27632 stock-løsning med konsentrasjon  $10^{-2}$  M laget i  $\text{H}_2\text{O}$  ble fortynnet i serumfritt medium til endelig konsentrasjon  $10^{-5}$  M.

## 3 METODER

### 3.1 Dyrking av celler til de enkelte forsøk

Når migrasjon ble undersøkt med farging, ble cellene trypsinert samme dag som forsøket startet. Når cellene skulle merkes med radioaktivt thymidin, måtte de være i logaritmisk vekstfase for å sikre at flest mulig celler inneholdt radioaktivitet. Omkring 2 millioner celler ble sådd ut i 75 cm<sup>2</sup> bokser med serumholdig medium og ble dyrket i et døgn ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i luft. Mediet ble deretter byttet, og det ble samtidig tilsatt 100 µl radioaktivt thymidin (fortynnet med kald thymidin slik at spesifikk aktivitet var 0,125Ci/mmol, og mediet inneholdt 1 µCi/ml radioaktivitet). Etter dyrking i enda et døgn ble cellene trypsinert, sentrifugert og resuspendert i ønsket medium, som angitt for de enkelte cellelinjene, til en tetthet på 0,5 millioner/ml. Dette ble gjort ved å fjerne mediet, skylle cellene 2 ganger med sterilt saltvann og tilsette 2 ml trypsin/EDTA-løsning for å løsne cellene. Dette ble gjennomført under sterile forhold i LAF-benk. Cellene ble inkubert i ca. 10 min ved 37 °C i inkubatoren og observert under mikroskop for å sikre at alle cellene har løsnet. Deretter ble det tilsatt 9 ml serumholdig medium for å inaktivere trypsin. Cellesuspensjonen ble overført til et sterilt rør og sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Mediet ble fjernet og cellene resuspendert til en konsentrasjon på 0,5 x 10<sup>6</sup> celler/ml i serumholdig eller serumfritt medium. Hundre mikroliter av denne celsuspensjonen ble sådd ut i Transwell inserts (kamre med semipermeabel membran med porestørrelse 8 µm) i 12 brønners Costar brett.

Stoffer som hemmer eller stimulerer cellemigrasjon ble fortynnet med serumfritt medium til ønsket konsentrasjon. 600 µl av fortynningene ble overført til bunnen av brønnen.

Brønnplatene ble inkubert i 22-24 timer ved 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> i luft.

### 3.2 Migrasjonsassay

#### 3.2.1 Fargemetoden

Til å begynne med ble medium fra innsiden av kamrene fjernet forsiktig uten å forstyrre cellene på filteret ved å suge mediet opp med mikropipette. Kamrene ble skylt 2 ganger med PBS og deretter fiksert med paraformaldehyd i 2 minutter ved romtemperatur.

Paraformaldehyd ble fjernet og insertene skylt 2 ganger med PBS. Cellene ble permeabilisert med 100 % metanol i 20 minutter ved romtemperatur. Deretter ble metanol fjernet og

kamrene skylt 2 ganger med PBS. Kamrene ble flyttet til et nytt brett tilsatt Giemsa-løsning. Cellene ble farget i 15 minutter ved romtemperatur.

Bomull vattpinner ble brukt for forsiktig å fjerne ikke-vandrende celler fra innsiden av kamrene. Deretter ble cellene som har festet seg til undersiden av membranen telt under 40x forstørrelse under mikroskopet ved å velge 6 tilfeldige felt. Tallene fra feltene ble lagt sammen til et tall for hvert kammer.

### **3.2.2 Radioaktiv merking**

Radioaktiv merking er en metode hvor man måler opptak av radioaktivt thymidin i celler som produserer nytt arvestoff. Thymidin er en av de 4 byggesteiner som er nødvendig for å danne nytt arvestoff. Når radioaktiv thymidin tilsettes en cellesuspensjon, vil de cellene som produserer DNA som forberedelse til deling, bli radioaktivt merket.

Etter inkubering ble mediet fra innsiden fjernet ved hjelp av mikropipette for å unngå å skade filteret. Fuktede vattpinner ble brukt for å skrape cellene fra oversiden og undersiden av filteret. Deretter ble vattpinnene knekt og puttet i hver sine tellerør. En prøve på 100 µl ble også tatt fra nedre kammer for å detektere radioaktivitet i mediet som vil kunne påvirke resultatene, hvis det følger med de cellene som skrapes. Det ble dermed brukt totalt 3 tellerør for hvert kammer. Når alle cellene var høstet, ble hvert tellerør fylt med 4 ml scintillasjonsvæske (Opti-Fluor, PerkinElmer). Deretter ble rørene rystet i 30 minutter og så telt i en Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counter. Tallene ble oppgitt i DPM som indikerer antall desintegrasjoner som detekteres i løpet av ett minutt.

### **3.3 Statistisk analyse av data**

Telletall uttrykt i DPM ble eksportert til Excel, der andel migrerte celler for hvert forsøk ble beregnet. Andel migrerte celler ble beregnet ut fra telletallene på undersiden av membranen i forhold til totalt telletall fra både undersiden og oversiden. Det ble tatt gjennomsnitt av triplikatene. Hvert forsøk ble også kjørt flere ganger, og de endelige resultatene er gjennomsnittet av alle forsøkene.

Grafene ble tegnet på dataprogrammet GraphPad Prism 5, og statistisk analyse ble foretatt ved hjelp av ANOVA enveis variansanalyse med Bonferronikorreksjon for parvis sammenligning.



Resultatene ble ansett som signifikante dersom p var mindre enn 0,05. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.

## **4 RESULTATER**

### **4.1 Innledende forsøk**

I de innledende forsøkene ble det utprøvd ekvilibrering av insertene en time før cellene ble sådd ut, konsentrasjon av cellesuspensjonen som sås ut, serumholdig og serumfri cellesuspensjon, serumholdig medium i bunnen og ulike inkubasjonstider.

Preinkubering og ekvilibrering av insertene viste seg å være uten betydning for migrasjonsgraden. Det ble laget to konsentrasjoner av cellesuspensjonen på 25000 og 50000 celler/ml og sistnevnte viste seg å være optimal. Inkubasjonstidene varierte mellom 22 og 24 timer, som vanligvis var brukt i tidligere publikasjoner.

Basert på forsøk med serumholdig og serumfri cellesuspensjon ble det bestemt å så ut cellene med serumholdig medium og bytte til serumfritt medium etter 1 time, slik at cellene får tid til å feste seg på filteret. Store celler som HPAF-II viste seg å løsne av insertene ved bytte av medium etter 1 time. Derfor ble medium byttet etter 2 timer. Serumholdig medium med 10 % konsentrasjon ga bedre resultater sammenliknet med 1 %.

Det ble gjort en positiv test på migrasjonen gjennom insertene ved å ha serumholdig medium i bunnen. Dette ga mye migrasjon av cellene. Serumfritt medium ble benyttet videre i forsøkene som negativ kontroll.

Under radioaktiv merking ble det innledningsvis undersøkt om ulik mengde radioaktivitet kan påvirke resultatene. Det ble utprøvd 100 µl og 250 µl radioaktiv merket thymidin og det viste like resultater ved begge volumene. Derfor ble 100 µl benyttet videre i forsøkene.

### **4.2 Farging versus radioaktiv merking**

Ved bruk av fargemetoden observerte vi at det var stor variasjon i migrasjon mellom insertene. Det kunne dessuten være stor variasjon fra område til område. Ved sammenligning av fargemetoden med radioaktiv merking ble cellene delt i to porsjoner, den ene ble tilsatt radioaktiv thymidin et døgn før forsøket startet. Cellene ble sådd ut med serumholdig medium i insertene og byttet ut til serumfritt medium etter 1 time. De ble høstet etter 22-24 timers inkubering.

På bakgrunn av tidligere studier spiller HGF en viktig rolle i stimulering av cellemigrasjon i ulike krefttyper. Den viste også noe stimulerende effekt i innledende forsøk. Derfor ble HGF brukt i sammenligningsforsøkene.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre replikater. Migrasjonsindeks for radioaktivt merkede celler er beregnet fra andel migrerte celler i en forsøksgruppe/andel migrerte celler i kontroll-gruppen. Ved fargemetoden var det ikke mulig å finne andel migrerte celler, derfor ble totalt antall migrerte HGF-stimulerte celler sammenlignet med totalt antall migrerte celler for kontrollen.

I fem forsøk med samme forsøksdesign men ulike celler ble det gjort en direkte sammenligning av de to metodene. Resultatet er oppsummert i tabellen under.

		Fargemetoden			Radioaktivitet		
	Cellelinje	Kontroll	HGF-stimulert	Migrasjonsindeks	Kontroll %	HGF-stimulert %	Migrasjonsindeks
1	PANC-1	31.33 $\pm$ 9,6	18.33 $\pm$ 9,2	0,6	25,13 $\pm$ 0,3	23,3 $\pm$ 2,45	0,93
2	HPAF-II	6 $\pm$ 2,3	202 $\pm$ 13,6	33,67	1,96 $\pm$ 0,86	3,13 $\pm$ 0,79	1,6
3	HPAF-II	92 $\pm$ 11,1	94.67 $\pm$ 13,9	1,03	30.52 $\pm$ 8,1	48.2 $\pm$ 3,8	1.6
4	ASPC-1	5.33 $\pm$ 2,0	25 $\pm$ 10,3	4,7	1.46 $\pm$ 0,05	3.09 $\pm$ 0,03	2,12
5	ASPC-1	16.7 $\pm$ 3,2	271 $\pm$ 81	16,3	1,92 $\pm$ 0,12	11,34 $\pm$ 1	5,9

Som tabellen viser fant vi samme trend i migrasjonsindeks med de to metodene, selv om absolutte verdier til dels ble nokså forskjellige. Det var mindre variasjon i parallellene ved radioaktiv merking enn farging. I tillegg gir radioaktiv merking et objektivt tall, mens fargemetoden kan påvirkes av subjektive valg av hvilke felt som telles. Dermed ble radioaktiv merking anvendt videre i forsøkene.

I forsøk 3 og 4 ble det brukt HGF fra Sigma. Den viste seg å ha dårlig effekt. I tillegg til den biologiske variasjonen mellom de ulike cellene kan bruk av ulike batcher av HGF stock-løsning forklare noe av variasjonen mellom forsøkene.

### **4.3 Effekt av ulike agonister på cellemigrasjon**

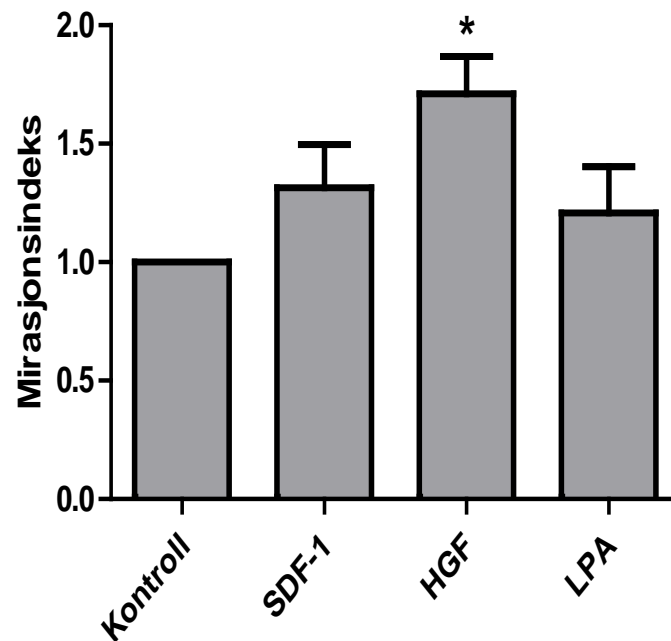
Vi karakteriserte initialt de fire cellelinjene med hensyn på respons på HGF, SDF-1, LPA og PGE2. HGF viste effekt i innledende forsøk, og i parallelle forsøk med skrapeassay ble det også funnet effekt av HGF, EGF og LPA i tre av cellelinjene (Ingvild Brusevold, upubliserte data). Panc-1-cellene viste seg å ikke være egnet til skrape-assay. I tillegg tyder ulike publikasjoner på at HGF har stimulerende effekt på migrasjon og invasjon i alle de fire cellelinjene [42-46]. PGE2 er vist å stimulere migrasjon og invasjon i flere typer kreftceller [47-50], og i en publikasjon er det vist effekt av PGE2 på migrasjon i Panc-1-celler [51].

#### **4.3.1 Stimulering av migrasjon i AsPC-1-celler**

Cellene ble sådd ut og dyrket et døgn i serumholdig medium. Dagen etter ble mediet byttet, og det ble tilsatt 100 µl radioaktivt merket thymidin. Etter merking med radioaktivt thymidin i 1 døgn ble cellene trypsinert og sådd ut med serumholdig medium i insertene i 24-brønnsplate og stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF eller  $10^{-5}$  M LPA. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Medium i insertene ble byttet til serumfritt medium etter 1 time. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk i figur 7.

Migrasjonsindeks for radioaktivt merkede celler er beregnet fra andel migrerte celler i en forsøksgruppe/ andel migrerte celler i kontrollgruppene. Dette ble benyttet for å normalisere den store variasjonen i basal migrasjon i kontrollgruppene i de enkelte eksperimentene.

ANOVA analyse med Bonferroni korreksjon viste signifikant høyere migrasjonsindeks ved HGF-stimulering sammenlignet med kontrollen ( $p < 0,05$ ), mens SDF-1 og LPA ga en ikke-signifikant stimulering av cellemigrasjonen. SDF-1 og LPA økte migrasjonen i 2 av 3 forsøk.



**Figur 7: Migrasjon i AsPC-1-celler**

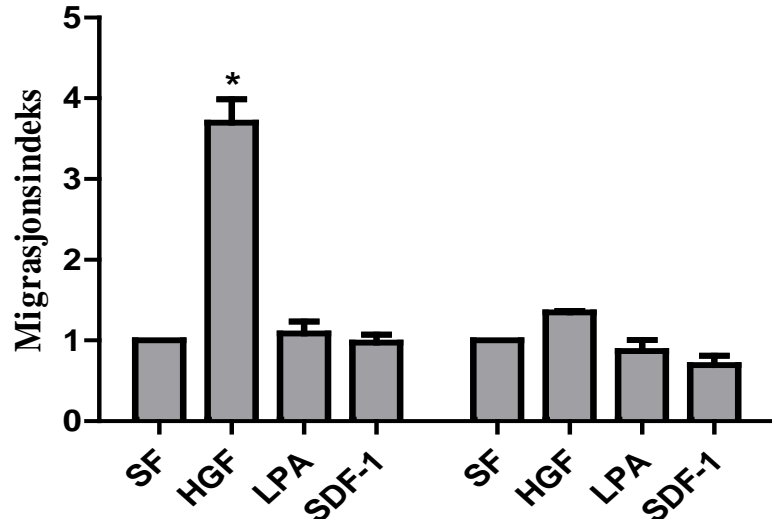
AsPC-1-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de sådd ut og stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF eller  $10^{-5}$  M LPA. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.2 Stimulering av migrasjon i HPAF-II-celler

HPAF-II-cellene ble behandlet på samme måte som beskrevet for AsPC-1-celler, bortsett fra at cellene gikk i to timer med serumholdig medium før det ble byttet til serumfritt. Dette ble gjort fordi cellene så ut til å feste seg langsommere enn AsPC-1-cellene. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Figur 8 viser to uavhengige forsøk der det ene viste signifikant økt migrasjonsindeks av HGF-stimulerte celler i følge ANOVA-analysen ( $p < 0,05$ ). Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av triplikater.

I begge forsøkene ble det benyttet HGF-stock løsning fra Sigma, som senere viste seg å ha dårlig effekt. Totalt ble det gjort 4 forsøk med litt varierende betingelser, der HGF ble brukt. 3 av de 4 ga en gjennomsnitts migrasjonsindeks på  $4,04 \pm 1,62$  (SEM), mens det fjerde forsøket ikke viste effekt av HGF. Samlet sett tyder dette på at HGF har en stimulerende effekt i HPAF-II-cellene, men det er nødvendig å gjøre flere forsøk.



**Figur 8: Migrasjon i HPAF-II-celler**

HPAF-II-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de sådd ut og stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF eller  $10^{-5}$  M LPA. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av triplikater. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).

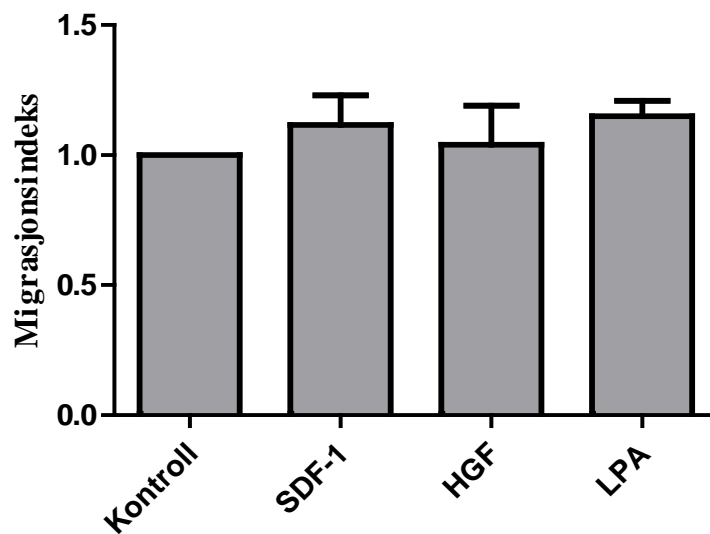
### 4.3.3 Stimulering av migrasjon i Panc-1-celler

Cellene ble behandlet på samme måte som tidligere og stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF eller  $10^{-5}$  M LPA. Medium i insertene ble byttet til serumfritt medium etter 1 time. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk i figur 9.

Resultatene viste ingen stimulering av cellemigrasjon i følge ANOVA analysen med Bonferroni korreksjon. I to av de tre forsøkene hadde HGF signifikant effekt, men i det tredje ble det ingen effekt, og derfor ble heller ikke resultatet signifikant.

I alt 8 forsøk ble gjort med HGF. I fem av dem var det signifikant effekt med gjennomsnittlig migrasjonsindeks på  $1,41 \pm 0,06$ .



**Figur 9: Migrasjon i Panc-1-celler**

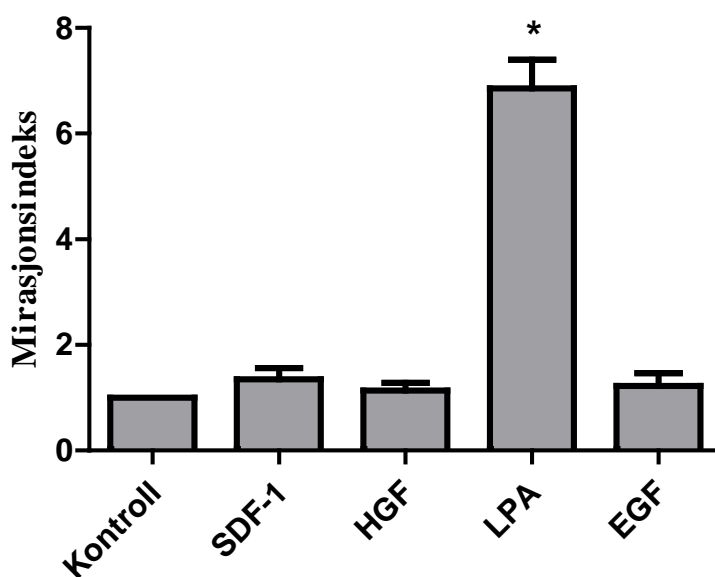
Panc-1-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF eller  $10^{-5}$  M LPA. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk.

#### 4.3.4 Stimulering av migrasjon i BxPC-3

Samme eksperimentelle oppsett som beskrevet for AsPC-1-cellene ble benyttet for BxPC-3-cellelinjen. I tillegg ble cellene stimulert med EGF 10 nM. Cellene ble sådd ut serumfritt.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk i figur 10.

Figuren viser at migrasjonsindeksen er signifikant høyere ved LPA stimulering ( $p < 0,05$ ) i forhold til kontrollen. SDF-1, HGF og EGF hadde ingen effekt på migrasjonen.



**Figur 10: Migrasjon i BxPC-3-celler**

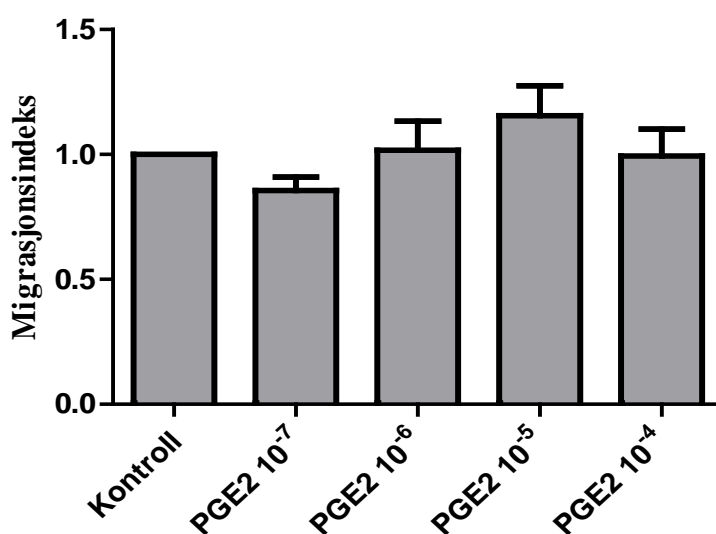
BxPC-3-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med 100 ng/ml SDF-1, 40 ng/ml HGF,  $10^{-5}$  M LPA eller EGF 10 nM. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).



### 4.3.5 Effekt av PGE2 i AsPC-1-celler

Cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium og ytterligere et døgn med 100  $\mu$ l radioaktivt merket thymidin før de ble sådd ut med serumholdig medium i insertene i 24-brønnsplate og stimulert med PGE2 i fire ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M. Medium i insertene ble byttet ut med serumfritt medium etter 1 time. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Migrasjonsindeks for radioaktivt merkede celler er beregnet fra andel migrerte celler i en forsøksgruppe/ andel migrerte celler i kontrollgruppene. Dette ble benyttet for å normalisere den store variasjonen i basal migrasjon i kontrollgruppene i de enkelte eksperimentene. Resultatene er presentert i figur 11 som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk og viser etter ANOVA-analyse med Bonferroni korreksjon ingen signifikant økning i migrasjon i AsPC-1 celler etter stimulering med PGE2. I ett av forsøkene ble HGF-effekten sammenliknet med PGE2. HGF hadde ingen stimulerende effekt på migrasjonsindeks i dette forsøket.



**Figur 11: Effekt av PGE2 på migrasjon i AsPC-1-celler**

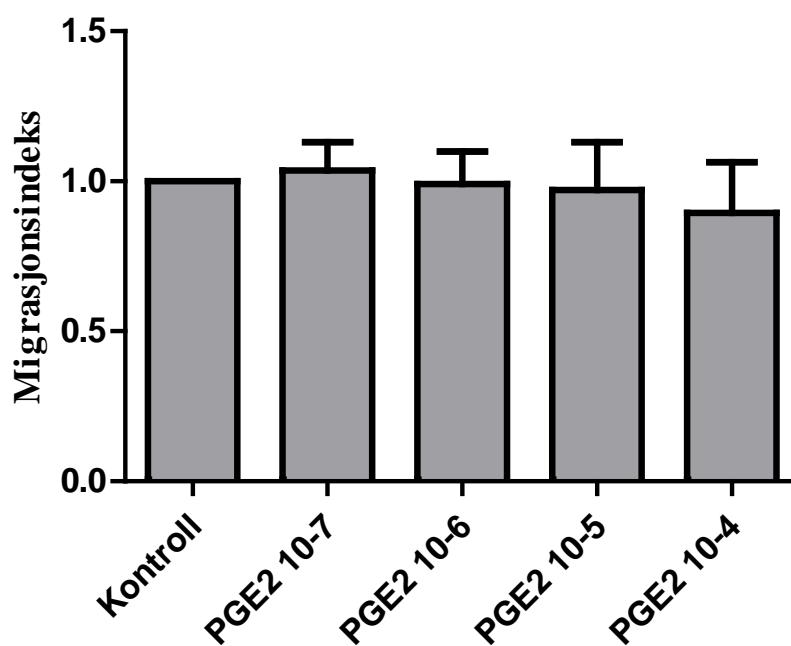
AsPC-1-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med PGE2 i fire ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk.

#### 4.3.6 Effekt av PGE2 på migrasjon av HPAF-II-celler

Cellene ble behandlet på samme måte som tidligere beskrevet og stimulert med fire ulike konsentrasjoner av PGE2,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M. Medium i insertene ble byttet til serumfritt medium etter 2 timer. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. PGE2 ga ingen signifikant endring i migrasjonsindeksen (figur 12).

I to av forsøkene ble HGF også benyttet. Ett av forsøkene viste veldig lav stimulerende effekt på migrasjonsindeks, mens det andre forsøket ga en signifikant økning i migrasjonsindeks. Ny HGF-stock-løsning fra Calbiochem ble brukt under sistnevnte forsøk.



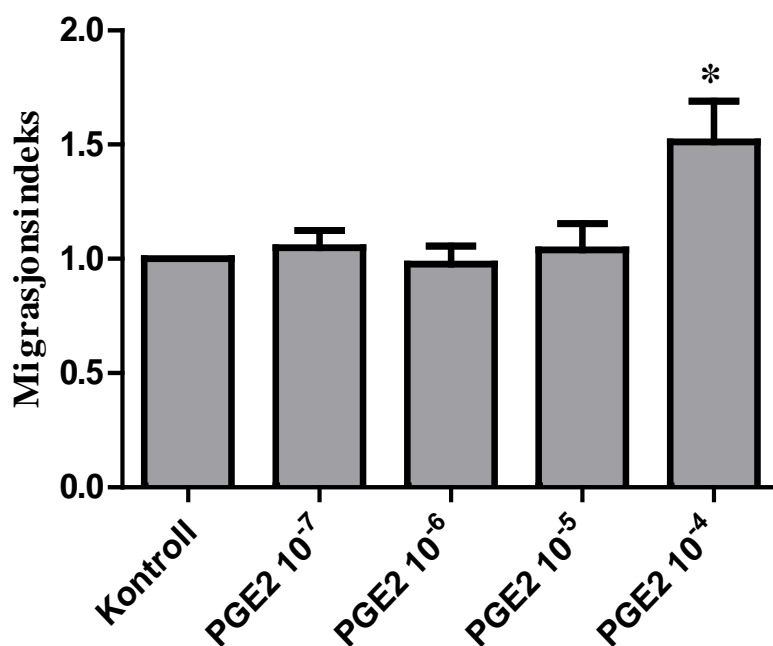
**Figur 12: Effekt av PGE2 på migrasjon i HPAF-II-celler**

HPAF-II-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med PGE2 i fire ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk.

#### 4.3.7 Effekt av PGE2 i Panc-1-celler

Cellene ble stimulert med fire ulike konsentrasjoner av PGE2 ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M). Medium i insertene ble byttet ut med serumfritt medium etter 1 time. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk i figur 13. PGE2  $10^{-4}$  M hadde en signifikant stimulerende effekt på migrasjon i Panc-1-cellelinjen ( $p < 0,05$ ). HGF viste ingen signifikant stimulering på cellemigrasjonen i noen av forsøkene.



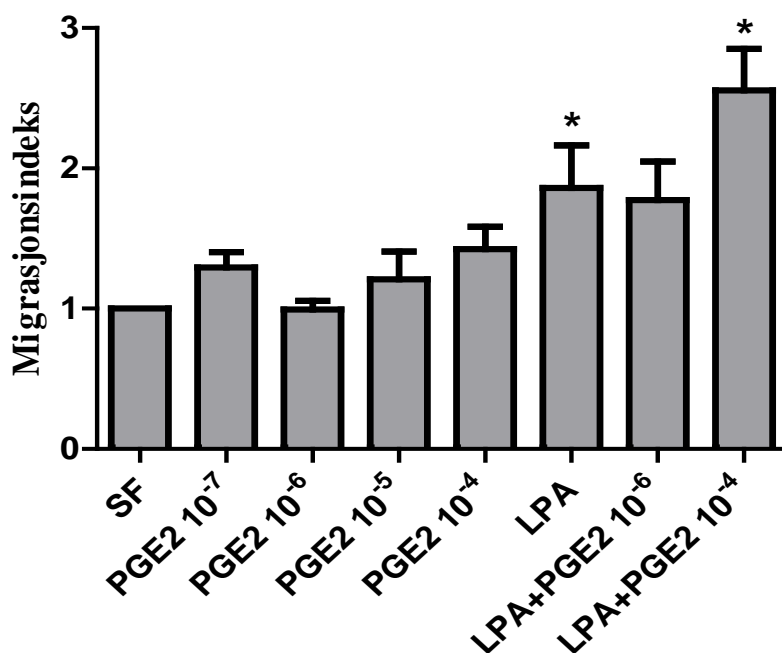
**Figur 13: Effekt av PGE2 på migrasjon i Panc-1-celler**

Panc-1-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med PGE2 i 4 ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ -  $10^{-4}$  M. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.8 Effekt av PGE2 alene og i kombinasjon med LPA på migrasjon i BxPC-3-celler

Cellene ble stimulert på samme måte som tidligere med fire ulike konsentrasjoner av PGE2 ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M). I tillegg ønsket vi å undersøke om PGE2 har effekt på LPA-stimulert migrasjon. Cellene ble stimulert med  $10^{-5}$  M LPA, LPA+ $10^{-6}$  M PGE2 og LPA+ $10^{-4}$  M PGE2. De ble sådd ut serumfritt. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk i figur 14. PGE2  $10^{-4}$  M hadde høyest stimulerende effekt på BxPC-3-celler, men dette var ikke signifikant. LPA viser en signifikant økning i migrasjonsindeks. LPA+ $10^{-4}$  M PGE2 ga også en signifikant effekt på stimulering av migrasjon sammenliknet med kontroll ( $p < 0,05$ ).



**Figur 14: Effekt av PGE<sub>2</sub> på migrasjon i BxPC-3-celler**

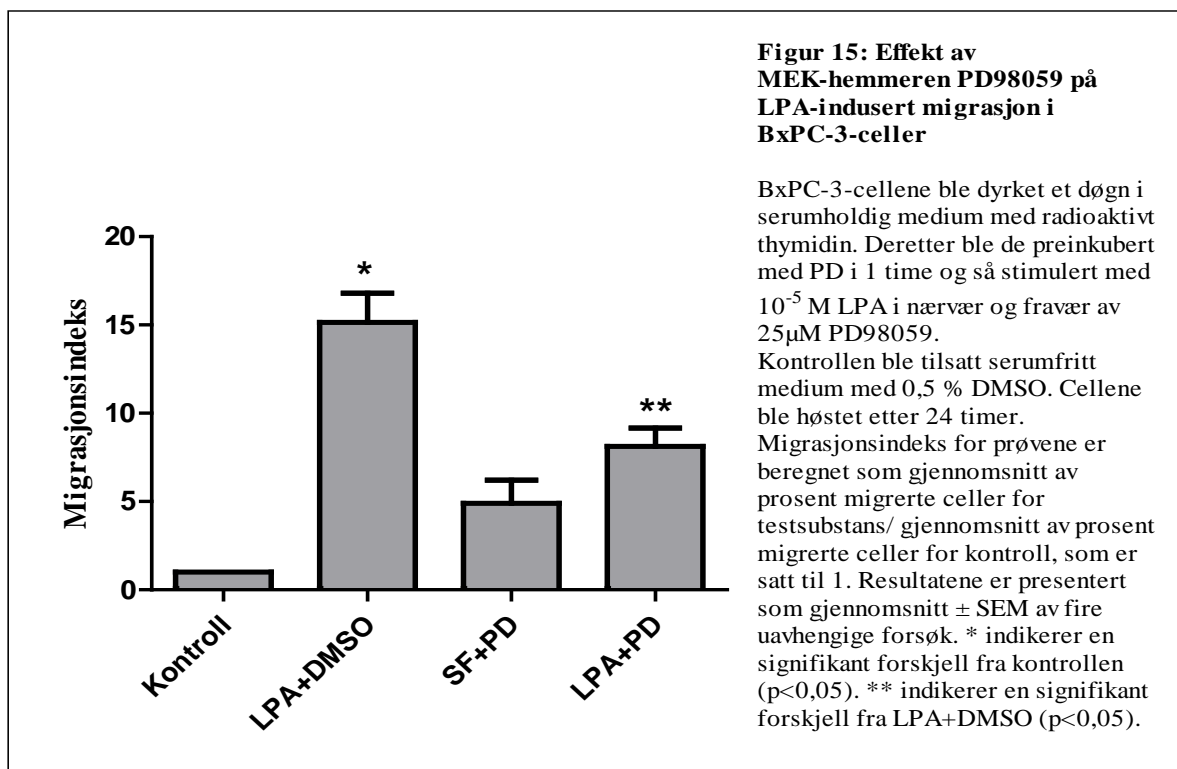
BxPC-3-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med PGE<sub>2</sub> i 4 ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ -  $10^{-4}$  M, LPA  $10^{-5}$  M, LPA+ $10^{-6}$  M PGE2 og LPA+ $10^{-4}$  M PGE2. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble sådd ut serumfritt og høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 Signalveier involvert i LPA-stimulert migrasjon i BxPC-3-celler

### 4.4.1 Betydning av ERK-signalveien

BxPC-3-cellene hadde en god respons ved stimulering med LPA, som vist i figur 10. Vi ønsket derfor å undersøke hvilke signalveier som er involvert. En MEK1 inhibitor, PD98059, forkortet PD, ble benyttet for å undersøke om stimuleringen er mediert via MAP-kinase kaskaden.

Cellene ble merket et døgn i serumholdig medium tilsatt radioaktivt merket thymidin før de ble sådd ut i insertene. Cellene ble preinkubert med PD både i inserten og i bunnen i 1 time. Deretter ble løsningene i bunnen byttet ut til  $10^{-5}$  M LPA + 0,5 % DMSO, 25  $\mu$ M PD og LPA+PD. Kontrollen ble tilsatt serumfritt medium og 0,5 % DMSO. Platen ble inkubert 24 timer ved 37 °C. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk. Resultatene er vist i figur 15. ANOVA analysen viste signifikant forskjell i migrasjonsindeks ved LPA-stimulert migrasjon. PD ga en partiell (ca. 50 %), men signifikant blokkering av LPA-stimulering. PD alene hadde en stimulerende effekt på migrasjonen, men dette var ikke signifikant forskjellig fra kontrollen.



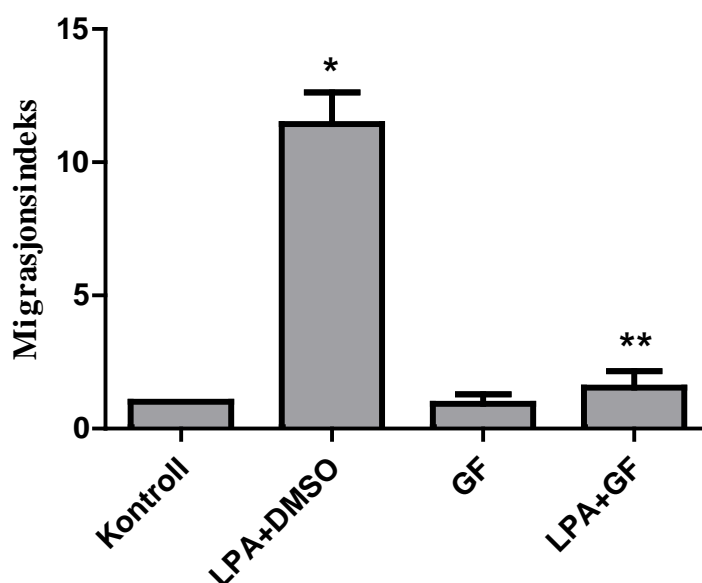
## 4.4.2 Betydning av protein kinase C

### 4.4.2.1 Effekt av PKC-hemmer på LPA-indusert migrasjon i BxPC-3-celler

GF109203X ble benyttet for å undersøke om LPA-stimulering av migrasjon medieres via protein kinase C (PKC).

Cellene ble dyrket og inkubert som tidligere. Etter preinkubering i en time med blokkeren ble løsningsene i bunnen byttet ut til  $10^{-5}$  M LPA+ 0,5 % DMSO, 10  $\mu$ M GF og LPA+GF.

Kontrollen ble tilsatt serumfritt medium og 0,5 % DMSO. Platen ble inkubert 24 timer ved 37 °C. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk i figur 16. Resultatene viste en fullstendig og signifikant blokkering av LPA-stimulering via GF ( $P < 0,05$ ). GF alene hadde ingen effekt på migrasjonen.



**Figur 16: Effekt av PKC-hemmer på LPA-indusert migrasjon i BxPC-3-celler**

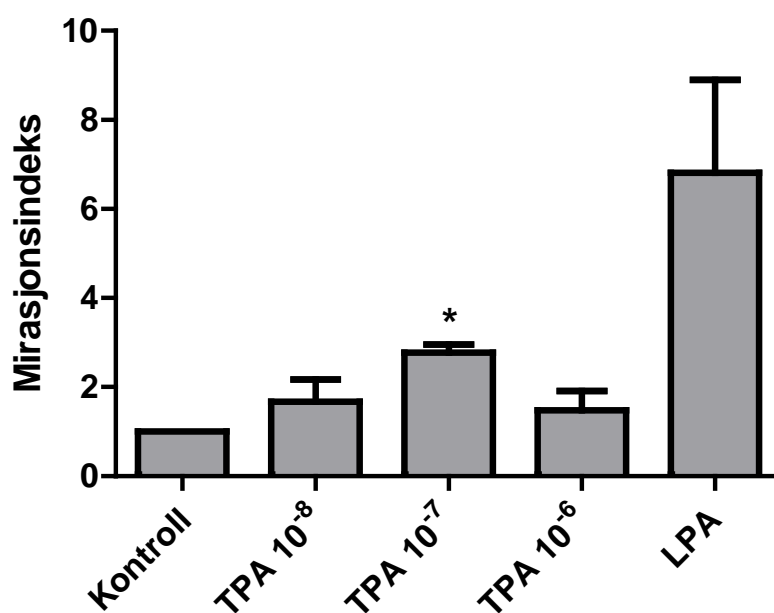
BxPC-3-cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med  $10^{-5}$  M LPA i nærvær og fravær av 10  $\mu$ M GF109203X, en PKC-hemmer. Kontrollen ble tilsatt serumfritt medium og 0,5 % DMSO. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ). \*\* indikerer en signifikant forskjell fra LPA+DMSO ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2.2 Effekt av TPA på migrasjon i BxPC-3-celler

Siden GF109203X viste fullstendig blokkering av LPA-stimulert migrasjon, ønsket vi også å undersøke effekten av en potent PKC-aktivator, TPA, på stimulering av migrasjon.

Cellene ble stimulert med tre ulike konsentrasjoner av TPA ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M). Cellene ble sådd ut serumfritt. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk i figur 17. Den viser en signifikant økning i migrasjonsindeks ved  $10^{-7}$  M TPA ( $p < 0,05$ ). TPA ( $10^{-7}$  M) hadde mindre effekt enn LPA i disse forsøkene. LPA-effekten er ikke tatt med i den statistiske analysen.



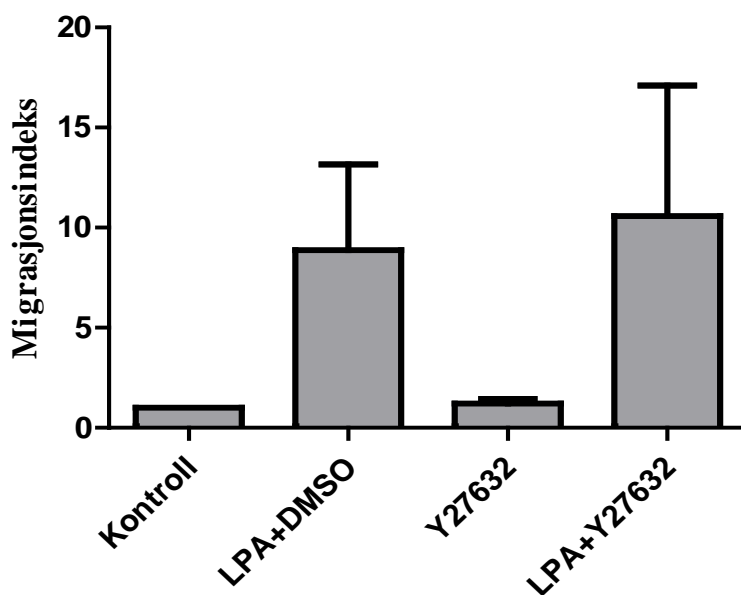
**Figur 17: Effekt av TPA på migrasjon i BxPC-3-celler**

BxPC-3-cellene ble merket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M TPA og  $10^{-5}$  M LPA. Kontrollen ble tilsatt serumfritt medium med DMSO (0,5%). Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll, som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. \* indikerer en signifikant forskjell fra kontrollen ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.3 Betydning av Rho kinase

Rho og Rho kinase er involvert i reorganisering av cytoskjelettet, og anses å være sentrale i regulering av cellemigrasjon [12]. For å undersøke om Rho kinase medierer effekten av LPA på migrasjon i BxPC-3 cellene, ble en potent ATP-kompetitiv Rho kinase inhibitor Y 27632,  $10^{-5}$  M, brukt for å undersøke om stimuleringen er mediert via Rho kinase.

Samme forsøksdesign som tidligere med en times preinkubering med blokkeren ble gjennomført med Y27632. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk i figur 18. De viste ingen signifikant stimulering eller blokkering av migrasjonen ( $P < 0,05$ ). LPA stimulert migrasjonsindeks i disse 4 forsøkene varierte fra 2,69 til 21,16 og det ble derfor stor spredning, men ingen av forsøkene tyder på at Rho kinase-hemmeren hadde en hemmende effekt.



**Figur 18: Betydning av Rho kinase for LPA-indusert migrasjon i BxPC-3-celler**

BxPC-3-cellene ble dyrket et døgn i serumholdig medium med radioaktivt thymidin. Deretter ble de stimulert med  $10^{-5}$  M LPA og  $10^{-5}$  M Y27632. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Cellene ble høstet etter 22-24 timer. Migrasjonsindeks for prøvene er beregnet som gjennomsnitt av prosent migrerte celler for testsubstans/ gjennomsnitt av prosent migrerte celler for kontroll (Kun medium) som er satt til 1. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av fire uavhengige forsøk.



## 5 DISKUSJON

### 5.1 Metodologiske aspekter

#### 5.1.1 Analysemetoden

Migrasjon gjennom en semipermeabel membran er en mye brukt metode til å studere cellemigrasjon, og er særlig godt egnet dersom en vil studere hvordan stromale celler påvirker migrasjon av kreftceller. Mens skrape-assay er veletablert i laboratoriet, og preliminare data med cellelinjer fra pankreas forelå, var metoden for migrasjon gjennom en semipermeabel membran (her undersøkt med Transwell kamre) ikke utprøvd på avdelingen tidligere. En utfordring ved Transwell-metoden er å trypsinere cellene slik at de hovedsakelig foreligger som enkeltceller i suspensjon. Ved for kortvarig trypsinering kan det dannes celleklumper som er vanskelige å resuspendere som enkeltceller, mens ved for kraftig trypsinering kan adhesjonsmolekyler som er nødvendige for migrasjon skades. Hvis cellene klumper seg, vil de vanskelig kunne migrere gjennom porene i membranen. Det var forskjell på hvor lett de ulike cellelinjene løsnet ved trypsinering, og hvor lett det var å lage enkeltcellesuspensjoner av dem. Det var vanskelig å visualisere cellene og observere morfologien under forsøkene. Cellene må migrere gjennom et ikke-fysiologisk polykarbonat- eller polypropylenfilter med små porer (8  $\mu\text{m}$ ). Ved observasjon av filterporene under mikroskop, ble det notert at porene ikke er jevnt fordelt i insertene. Dette kan dermed påvirke migrasjonsgraden fra insert til insert og kan være en av årsakene til variasjon i resultatene. Det er også vanskelig å oppnå nøyaktige og statistisk signifikante resultater når kun et lite antall celler krysser filteret eller når distribusjon og/eller farging av celler er ujevn.

Celler fra ulike cellelinjer har ulik morfologi og migrerer ulikt. Den biologiske variasjonen mellom de ulike cellelinjene gir variasjon i resultatene. Det var også tydelig variasjon fra forsøk til forsøk med samme cellelinje. Blant annet observerte vi variasjon i basal migrasjon i BxPC-3-cellene. I utgangspunktet hadde de høy basal migrasjon når de ble sådd ut med serum og byttet til serumfritt medium etter 1 time, derfor valgte vi å så dem ut med serumfritt medium. Til tross for det observerte vi en variasjon i basal migrasjonen fra forsøk til forsøk, fra 2-3 % og opp til 30 %. Når basal migrasjon var høy, var det vanskelig å få fram stimulerende effekter. Variasjonen kan skyldes rester av serumholdig medium som satt igjen ved resuspending med serumfritt medium. Cellenes respons på LPA-stimulering varierte fra

2x til 15x økning. Noe av variasjonen hadde sammenheng med basal migrasjon, men det må også være andre faktorer som bidrar. Cellene var frosset ned i aliquoter, og det ble tatt opp nye celler fra celletanken flere ganger i løpet av forsøksperioden. Det er tenkelig at cellene kan ha noe ulike egenskaper fra batch til batch. Det var imidlertid variabel respons på LPA også innen samme batch av celler. Hvor mye cellene blir behandlet og trypsinert under forsøkene kan også føre til ulike resultater.

BxPC-3-cellene er heterogene, og består av noen store og mange små celler. Panc-1-cellene er store celler som er vanskelige å lage enkeltcelle-suspensjon av. HPAF-II-celler er mindre enn Panc-1-cellene, men hadde en tendens til å danne små celleaggregater slik at det kunne være varierende mengder enkeltceller i suspensjonen. AsPC-1-cellene var enklest å lage enkeltcelle-suspensjon av, men så ikke ut til å migrere i særlig grad.

Panc-1-, AsPC-1-, og HPAF-II-cellene ble sådd ut serumfritt i starten, men det viste seg at de løsnet lett fra membranen ved høsting. Derfor ble det valgt å så ut cellene med serum og inkubere i 1 eller 2 timer, avhengig av adhesjonsevnen til cellene, og bytte til serumfritt medium etterpå. Det kan også være gunstig å coate insertene med fibronektin eller kollagen, hvis cellene har høy basal migrasjon (for eksempel BxPC-3-cellelinjen).

Migrasjonsstudier har benyttet ulike inkubasjonstider på 16-48 timer avhengig av celletype. Det kunne dermed vært interessant å lage en tidskurve for migrasjon etter ulike inkubasjonstider, men dette ville kreve personlig tilstedeværelse på laboratoriet over store deler av døgnet.

DMSO ble benyttet som løsemiddel i en endelig konsentrasjon på 0,5 % i forsøkene med PD98059 og GF109203X. DMSO ansees som et inert løsemiddel, det vil si at det ikke påvirker biologiske systemer. Men cellene kan likevel påvirkes av løsemidlet, derfor ble det benyttet en lav konsentrasjon av DMSO og samme konsentrasjon av DMSO ble tilsatt kontrollene.

Det er dermed flere forhold som må vurderes med tanke på individuelle egenskaper til de enkelte cellelinjene som trypsineringstid, utsåing med eller uten serumholdig medium, eventuelt tidspunkt for bytting til serumfritt medium etter utsåing med serumholdig medium

og inkubasjonstid. Ytterligere optimalisering av metoden for de enkelte cellelinjene ville vært en fordel.

### **5.1.2 Radioaktiv merking versus farging av cellene**

Selv om cellene farges, kan det være vanskelig å visualisere cellene på grunn av variasjon i farge-graden og hvis cellene ikke ligger som enkeltceller. Det er viktig å skrape av alle celler som finnes på oversiden for å unngå at de blir telt som migrerte celler. Migrerte celler varierer i antall og posisjon i ulike brønner og ulike forsøk. Derfor blir det subjektivt hvilke felt som velges ved telling under mikroskop. Det er også viktig å unngå dobbelttelling av samme felt. Dette problemet ble minimalisert ved å velge flere felt for telling under mikroskopet og felter med flest celler ble valgt og lagt sammen til et tall. Hvis fargemetoden benyttes bør hele filteret telles for å unngå subjektive valg, men dette er tidkrevende.

Det er mange vasketrinn ved fremkallingen under farging. Dette kan føre til at mange celler løsner under denne prosessen og det vil påvirke resultatene. Det var dessuten vanskelig å skille hva som faktisk var celler, da celler som hadde migrert gjennom membranen ofte hadde gjennomgått morfologiske endringer. I enkelte tilfeller var det også vanskelig å skille mellom migrerte celler og celler som ikke hadde migrert gjennom membranen.

Radioaktiv merking er en rask, enkel og objektiv metode. Enkelte forfattere fraråder imidlertid å merke cellene på forhånd med radioaktivitet eller fargestoffer, fordi dette kan tenkes å påvirke cellenes migrasjon. Det finnes kommersielt tilgjengelige metoder med merking av cellene etter at de har migrert, som tillater kvantitering av migrerte celler.

Før de radioaktivt merkede cellene ble telt med scintillasjonsteller, måtte de skrapes av membranen med en vattpinne. Denne skrapingen kan ha introdusert variasjoner i forsøkene, da cellene ikke var synlige og det var vanskelig å vite om alle cellene var kommet med. Cellene skrapes av både fra oversiden og undersiden av filteret og telles. Dermed gir det et forholdstall av migrerte celler i forhold til celler som opprinnelig var på oversiden.

## 5.2 Effekt av HGF og EGF på migrasjon i ulike bukspyttkjertelceller

Målet med denne studien var å undersøke effekten av ulike agonister på cellemigrasjon i svulstcellelinjer fra bukspyttkjertel. ErbB-reseptorer er sterkt involvert i onkogenese, og avvikende ErbB-aktivitet er assosiert med flere typer kreft [52]. Hvilke ligander for ErbB-reseptorene som er til stede, og hvilke ErbB-reseptorer som er til stede og kan danne homo- eller heterodimere, vil kunne gi stor variasjon i hvilke signalveier som aktiveres [53]. ErbB1-reseptorer kan også formidle en rekke signaler ved å transaktiveres via GPCR. De regulerer celleproliferasjon, angiogenese, motilitet, metastase og hemmer apoptose. Flere EGFR-hemmere (cetuximab, gefitinib og erlotinib) har blitt utviklet som kan hemme tumorvekst, og i noen tilfeller forårsake tumorregresjon. Når de brukes i kombinasjon med kjemoterapi eller stråling, har EGFR-hemmere vært i stand til å potensierte effekten mot noen krefttyper som lungekreft [36, 54, 55]. De har imidlertid hatt liten effekt hos pasienter med bukspyttkjertelkreft, fordi bukspyttkjertelkreft ofte er karakterisert av mutasjoner i K-RAS, som ligger nedstrøms for EGFR [56].

EGFR er uttrykt i 90 % av bukspyttkjertelkreftceller [39], men ekspresjonen alene tyder ikke på at kreftceller er avhengige av EGFR signalveier og påviser ikke korrelasjon med klinisk respons på anti-EGFR-behandling. Konstitutiv aktivering av EGFR-signalveier kan føre til større avhengighet for EGFR. Det er vist mutasjon i EGFR-gen i Panc-1 og HPAF-II, men ikke i AsPC-1 og BxPC-3 [57]. En annen studie har også funnet EGFR uttrykk i Panc-1-celler [58]. Zhang og medarbeidere undersøkte ekspresjon av EGFR og andre ErbB-reseptorer i BxPC-3 og Panc-1. De fant høyt uttrykk av EGFR og HER-2 i begge cellelinjene, mens HER-4 ikke ble detektert. HER-3 var lavt uttrykt i BxPC-3-cellene, men ikke i Panc-1-cellene [59]. I denne oppgaven ble EGF-effekten kun undersøkt i BxPC-3-cellene. Det vil være av interesse å undersøke effekten av EGF i de andre cellelinjene. I likhet med HGF hadde EGF ingen effekt på migrasjonsindeks i BxPC-3-cellene (figur 10). Dette var noe overraskende, da det i laboratoriet er observert at LPA transaktiverer EGFR i disse cellene. LPA-stimulering fører til fosforylering av EGFR, og LPA-stimulert fosforylering av ERK og Akt hemmes av gefitinib, en EGFR tyrosinkinase-hemmer (Ingun Heiene Tveteraas, upubliserte data).

Met-ekspresjon er undersøkt i flere studier i de fire cellelinjene som er benyttet i denne oppgaven, men funnene varierer noe. Di Renzo og medarbeidere fant at BxPC-3-cellene hadde høyest ekspresjon, fulgt av AsPC-1 og HPAF-II, mens Panc-1 hadde lavest ekspresjon

[43]. Qian og medarbeidere fant derimot at AsPC-1 hadde høyere ekspresjon enn Panc-1, og BxPC-3 hadde lavest ekspresjon [60]. Maehara og medarbeidere fant også at AsPC-1 hadde høyere ekspresjon av Met enn BxPC-3-cellene [44].

HGF er vist å stimulere invasiv adferd (scattering) i BxPC-3- og AsPC-1-celler [42], og HPAF-II-celler [43], migrasjon og invasjon av Panc-1-celler og invasjon av AsPC-1-celler [46]. At HGF stimulerer invasjon av Panc-1-celler er også beskrevet i en annen studie [45]. HGF er også rapportert å stimulere migrasjon og invasjon av AsPC-1-celler, men ikke av BxPC-3-celler [44].

I denne oppgaven ble effekten av HGF på cellemigrasjon undersøkt i fire cellelinjer fra bukspyttkjertelen, Panc-1, AsPC-1, HPAF-II og BxPC-3. Resultatene viste signifikant økt migrasjonsindeks kun i AsPC-1 celler (figur 7). Dette er i samsvar med andres funn [42, 44, 46]. I HPAF-II-celler var det variabel respons på HGF, men samlet sett tyder resultatene på at HGF har en liten stimulerende effekt i disse cellene. Noe av variasjonen kan skyldes at det ble benyttet to forskjellige leverandører av HGF under forsøkene, der Sigma-preparatet etter hvert viste seg å ha mye dårligere effekt enn HGF fra Calbiochem. Det bør dermed utføres flere forsøk og med samme HGF i HPAF-II-celler. I Panc-1-cellene var det ingen effekt ved stimulering med HGF når cellene ble sådd ut med serumholdig medium eller serumfritt i motsetning til hva Qian og medarbeidere fant [46]. Det var heller ikke noen respons på stimulering med HGF i BxPC-3-cellene. Dette er i samsvar med en publikasjon [44], mens en annen publikasjon har vist effekt på invasiv adferd [42]. Siden flere publikasjoner tyder på at Met er lavt uttrykt i BxPC-3 celler, kan det være grunnen til manglende effekt av HGF. Det ble observert litt høyere stimulering når cellene ble inkubert 16 timer, men dette viste ikke seg å være signifikant. Det er en fordel å undersøke kortere inkubasjonstid i disse cellene med tanke på å redusere basal migrasjon.

Det er sannsynlig at cellelinjene endrer egenskaper over tid, og det er derfor ikke uvanlig at studier som gjøres i ulike laboratorier over tid ikke alltid viser fullt samsvar.

### **5.3 Effekt av SDF-1 på stimulering av cellemigrasjon**

Flere studier har vist at bukspyttkjertel-cellelinjer uttrykker kjemokinreseptoren CXCR4 [24, 61-65], men funnene spriker noe. Noen rapporterer at BxPC-3-celler ikke uttrykker CXCR4 [24, 65], mens andre finner ekspresjon av CXCR4 [61], eller stimulering av invasjon med SDF-1 i BxPC-3 celler [66]. Flere studier har vist at SDF-1 stimulerer migrasjon og invasjon av AsPC-1 celler [61-64], og stimulering av migrasjon er også beskrevet i Panc-1-celler [24, 64]. Migrasjon og invasjon stimulert av SDF-1 ble helt blokkert av CXCR4-hemmere [64]. En CXCR4-blokker, plaxifor, ble testet in vivo i dyreforsøk og er vist å redusere metastasering ved kreft i bukspyttkjertel [54]. Disse resultatene antyder at nye terapeutiske strategier for å hemme metastasering av bukspyttkjertelkreft kan forventes, basert på manipulering av SDF-1 og CXCR4 ligand-reseptor systemet.

Mine forsøk viste ingen sikker effekt av SDF-1 i noen av cellelinjene. Figur 7 viser at SDF-1 stimulerte migrasjonen i ASPC-1- cellelinjen, men dette var ikke signifikant. Det var veldig lite økning i migrasjonsindeks i Panc-1- og BxPC-3-cellene. Det var gjort to forsøk med stimulering med SDF-1 i HPAF-II-cellene og det viste ingen effekt på migrasjon sammenliknet med kontroll. Disse forsøkene bør suppleres, og en bør også undersøke ulike konsentrasjoner av SDF-1. I mine forsøk brukte jeg 100 ng/ml, mens i noen studier har det vært maksimal effekt med 300 ng/ml SDF-1 [63].

### **5.4 Effekt av LPA på stimulering av migrasjon i de ulike cellelinjene**

Figur 10 viser at LPA har en signifikant stimulerende effekt på migrasjon i BxPC-3-celler. Den hadde en liten, men ikke signifikant stimulerende effekt i AsPC-1-celler. Den hadde ingen effekt på de andre cellelinjene. Effekten av LPA i BxPC-3-celler er også vist i tidligere studier [67-69]. Blokkering av ATX-enzymet som katalyserer LPA produksjonen har vist redusert invasjon og migrasjon i flere typer kreftceller [70]. Våre funn tyder på at LPA er en effektiv kjemoattraktant for BxPC-3-cellene og disse cellene ble derfor undersøkt videre med tanke på hvilke signalveier som er involvert.

I HPAF-II-cellene så vi ingen økning i migrasjonsindeks. Det var veldig lite stimulering i AsPC-1- og Panc-1-cellene sammenliknet med kontroll. Andre har imidlertid vist effekt av LPA på migrasjon i Panc-1 celler [67-69].

## 5.5 Effekt av PGE2 på migrasjon i ulike cellelinjer

Dyreeksperimentelle, epidemiologiske og kliniske studier har vist at et jevnlig inntak av ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) kan redusere risikoen for kreftutvikling. Det antas at denne effekten skyldes hemming av syklooksygenase (COX)-aktiviteten, og dermed redusert produksjon av PGE2 [20, 71-73]. Andre studier har vist at nivået av COX-2 er selektivt oppregulert i kolorektalkreft, bryst-, mage-, bukspyttkjertel-, lunge- og prostatakreft [74-76]. Mange kreftceller fra bukspyttkjertel mangler COX-1-uttrykk og noen mangler COX-2. Fibroblaster som uttrykker COX-1 og COX-2, er en sannsynlig kilde til prostaglandiner for bukspyttkjertelkreftceller som mangler COX [77].

COX-2-aktivitet er signifikant forhøyet i hamster og humane celler fra kreft i bukspyttkjertel, sammenlignet med normal bukspyttkjertel. Økt COX-2-uttrykk er en tidlig hendelse i bukspyttkjertel karsinogenese [54, 78].

Det er påvist en moderat ekspresjon av COX-2 i BxPC3, men ikke i AsPC-1 [79]. PGE2-produksjonen er forhøyet i BxPC-3- og HPAF-II-cellelinjer, forenlig med økt nivå av COX-2-uttrykk i disse cellelinjene. Derimot ble knapt målbare nivåer av PGE2 påvist i de COX-2-negative bukspyttkjertelcellelinjene (AsPC-1 og Panc-1) [80]. AsPC-1 og Panc-1 er generelt ansett å være mindre differensierte enn BxPC-3 og HPAF-II og PGE2-produksjon og ekspresjon av COX-2 synes å korrelere med celledifferensieringsgraden [81].

Disse data tyder på at COX-hemmere kan utøve sine virkninger i den COX-2-positive BxPC-3-cellelinjen ved å redusere PGE2-produksjon. Men i de COX-2-negative cellelinjene kan virkningen av COX-inhibitorer være mediert av COX-2- og PGE2-uavhengige mekanismer [82]. Det har vært foreslått at mangelen på COX-uttrykk i noen celler kan gjøre dem avhengige av andre kilder for PGE2, for eksempel fra stromale fibroblaster. Det ble også vist at stromale fibroblaster leverer PGE2 til kreftcellene via Mrp-4 transportører, og blokkering av Mrp4-avhengig PGE2-utskillelse fra fibroblaster reduserte proliferasjon i bukspyttkjertelceller som mangler COX-2 [77]. Migrasjon ble ikke undersøkt i dette arbeidet.

I denne oppgaven ble effekten av PGE2 i ulike konsentrasjoner,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M, undersøkt i fire ulike cellelinjer. Resultatene viste at PGE2 stimulerte migrasjonen i Panc-1-cellelinjen. Den høyeste konsentrasjonen av PGE2 på  $10^{-4}$  M ga en signifikant økning av migrasjonsindeks.

Dette samsvarer noe med tidligere studie utført på Panc-1-celler som viste 3,2 ganger økning i migrasjonsindeks ved stimulering med PGE2 men ved konsentrasjon  $10^{-5}$  M [51]. Lavere konsentrasjoner på  $10^{-5}$  M til  $10^{-7}$  M hadde ingen effekt på cellemigrasjonen i mine forsøk (figur 13).

I BxPC-3-celler var det høyest migrasjonsindeks ved stimulering med  $10^{-4}$  M PGE2, men det var ikke signifikant. Effekten var henholdsvis lavere ved  $10^{-7}$  M PGE2 og  $10^{-5}$  M PGE2. Det var ingen effekt ved stimulering med PGE2 med konsentrasjon  $10^{-6}$  M (figur 14). I disse forsøkene var den basale migrasjonen høy og LPA-effekten var ikke like sterk som observert i tidligere forsøk. Optimalisering av forholdene med fokus på basal migrasjon og inkubasjonstid er nødvendig. Sammenliknet med kontroll hadde PGE2 ingen effekt på AsPC-1- og HPAF-II-cellene (figur 11 og 12).

Det er kjent at PGE2 utfører sine effekter særlig via EP2/EP4-reseptorer ved kreft. Særlig spiller EP4-reseptorer en viktig rolle ved metastase i lunge- og kolorektalkreft [83]. En studie på Panc-1-cellelinjen undersøkte om PGE2 øker cellulær invasivitet ved å indusere matriks metalloproteinase-2 (MMP-2)-uttrykk. Studien viste signifikant økning av MMP-2. Induksjonen ble blokkert av MEK-hemmeren PD98059, men MAPK kinase-hemming påvirket ikke PGE2-mediert cellulær migrasjon. Dette funnet antyder at effekten av PGE2 på MMP-2 ekspresjon og cellulær migrasjon reguleres gjennom separate signalveier. Forfatterne foreslår videre at PGE2 kan aktivere flere signalveier som har synergieffekter på invasjon, og at COX-2 hemming kan representere en strategi for å hemme invasjon og metastasering ved kreft i bukspyttkjertelen [51].

PGE2 øker også cellemotiliteten ved kolorektalkreft via transaktivering av EGFR, gjennom PI3K/Akt signalering [47]. Senere studier viste at EP4-reseptorer rekrutterer  $\beta$ -arrestin og c-Src, og at dette fører til transaktivering av EGFR [48]. En lignende mekanisme er beskrevet i lungekreftceller [49]. Ved nyrekreft fremmer PGE2 celleinvasjon gjennom aktivering av EP4 og Rap [50].

In vivo mekanismen for hvordan COX-2 og PGE2 påvirker migrasjon av bukspyttkjertelkreftceller er ikke fullstendig klart. Derfor kan det være interessant å undersøke signalveiene som er involvert i stimuleringen grundigere.



## 5.6 Hemmer PGE2 effekten av LPA?

Det er kjent at cAMP kan ha både vekststimulerende og veksthemmende effekter, avhengig av celletype. Mens den veksthemmende effekten ser ut til å involvere hemming av ERK, er mekanismene for stimulering av cellevekst dårligere kartlagt [84].

Med denne bakgrunn ønsket vi å undersøke om PGE2 hemmer den LPA-induserte migrasjonen. PGE2 hadde ingen hemmende effekt på LPA-indusert migrasjon (figur 14). PGE2 ( $10^{-4}$  M) tilsatt sammen med LPA viste en additiv effekt med LPA og ga signifikant økt migrasjonsindeks sammenliknet med kontroll. Dette er en interessant observasjon som bør undersøkes videre. LPA tilsatt  $10^{-6}$  M PGE2 viste lik migrasjonsindeks som LPA alene, og dette samsvarer med at  $10^{-6}$  M PGE2 ikke hadde noen stimulerende effekt sammenliknet med kontroll. I endotelceller er det vist at IL-8 og SDF-1 i kombinasjon gir en sterkere migrasjon enn hver av dem alene [66].

I disse forsøkene var basal migrasjon høy, og LPA hadde mindre stimulerende effekt enn i tidligere forsøk. Det er viktig å optimalisere forholdene for å redusere basal migrasjon. Preinkubering av cellene med PGE2 kunne også prøves.

## 5.7 Signalveier involvert i LPA-stimulert migrasjon i BxPC-3-celler

I denne oppgaven har jeg undersøkt betydning av ERK, PKC og Rho kinase for LPA-stimulert migrasjon. Mine funn tyder på at PKC og ERK er involvert, men ikke Rho kinase. Stähle og medarbeidere viste at aktivisering av ERK er avgjørende for LPA-indusert migrasjon i Panc-1 og BxPC-3 celler. Hemming av ERK-aktivisering via PD98059 resulterte i tap av adhesjonsevne, nedbryting av aktin cytoskjelett og svekket cellemotilitet [67]. I likhet med hva jeg fant, ga PD98059 bare en delvis hemming av LPA-stimulert migrasjon, noe som tyder på at andre signalveier også er av betydning. Stähle og medarbeidere fant at LPA-stimulert migrasjon var Gi/o-avhengig, og at også hemming av JNK reduserte migrasjonen. I ulike celler er LPA-indusert ERK-aktivisering vist å være mediert av både Gi/o-proteiner og Gq-PLC-Ca<sup>2+</sup> og PKC signalveien [85, 86].

Siden LPA-reseptorer medierer sine effekter også via Gαq, kunne det være at PKC ligger oppstrøms for ERK. Derfor undersøkte vi om PKC-hemmeren GF109203X kunne blokkere LPA-indusert stimulering av migrasjon. Vi fant at GF blokkerte effekten av LPA fullstendig.

Det var ubetydelig variasjon i resultatene. For ytterligere å bekrefte effekten av PKC, stimulerte vi cellene med TPA, som er en potent aktivator av PKC. Responsen på TPA var relativt liten, og dessuten variabel. Ved  $10^{-7}$  M ga TPA en signifikant stimulering av migrasjonen, men effekten var betydelig mindre enn effekten av LPA i de samme forsøkene.

Det er kjent at TPA gir en vedvarende aktivering og deretter nedregulering av PKC, i motsetning til hva som skjer når man stimulerer med agonist [25]. Dette kan være en mulig forklaring på at TPA hadde liten effekt på migrasjonen, sammenlignet med LPA. En annen mulighet er at GF ved den anvendte konsentrasjonen hemmer andre kinaser, selv om GF er ansett som en relativ spesifikk hemmer av PKC [87]. Lavere konsentrasjoner av GF bør undersøkes i senere forsøk. Hvis PKC er involvert i migrasjon i BxPC-3-cellene induisert av LPA, er denne effekten sannsynligvis uavhengig av ERK. Som nevnt tidligere stimulerer LPA ERK via transaktivering av EGFR i BxPC-3-cellene, og blokkering av PKC hemmer ikke LPA-stimulert ERK fosforylering (Dagny Sandnes, upubliserte observasjoner). Effekten av gefitinib bør også testes, selv om EGF ikke hadde effekt på migrasjonen i BxPC-3 cellene i mine forsøk. I skrape-assay har gefitinib vist hemmende effekt på LPA-stimulert migrasjon i disse cellene (Ingvild Brusevold, upubliserte observasjoner).

Det er kjent at LPA-indusert cellemotilitet er mediert ved aktivering av G-proteiner og videre aktivering av Ras, Rac1 og RhoA [67]. G $\alpha$ 12/13/Rho-signalveien er vist å være involvert i LPA-stimulert migrasjon i ovarialkreftceller [88]. I en undersøkelse med BxPC-3- og Panc-1-celler er det funnet at LPA stimulerer migrasjon via LPA1-reseptorer og G $\alpha$ i, mens LPA2-reseptorer, via G $\alpha$ 12/13 og aktivering av Rho hemmer EGF-stimulert cellemigrasjon [68]. Om Rho kinase var involvert ble ikke undersøkt i dette arbeidet. Mens jeg ikke fant signifikant effekt av Rho kinase-hemmeren i mine forsøk, var det en tendens i to av fire forsøk til at den økte LPA-stimulert cellemigrasjon, noe som kan være forenlig med en LPA2-reseptor-mediert hemming av migrasjonen via Rho kinase. Dette bør undersøkes videre. Dessverre viste LPA-stimulert migrasjon i disse forsøkene stor spredning mellom forsøkene, og det gav utslag på ANOVA-analysen, ved at resultatene ikke ble statistisk signifikante. Også av den grunn er det nødvendig å gjøre flere forsøk.

## 6 KONKLUSJON

Resultatene i denne oppgaven indikerer at effektene av ulike agonister på cellemigrasjon er celletype-avhengig. Det er viktig å optimalisere metoden for de enkelte cellelinjene med tanke på inkubasjonstider, utsåing med eller uten serumholdig medium, eventuelt tidspunkt for bytting til serumfritt medium etter utsåing med serumholdig medium og trypsineringstid. LPA og TPA stimulerer migrasjon i BxPC-3-cellelinjen og blokkering av LPA-effekten viser at PKC-signalveien er involvert i stimulering av migrasjon i denne cellelinjen, og ERK-signalveien har også en rolle i stimuleringen. Rho-signalveien synes ikke å være involvert, men dette bør undersøkes grundigere. PGE2 i en konsentrasjon på  $10^{-4}$  M stimulerer migrasjonen i Panc-1-celler. Mens PGE2 ikke hadde noen effekt alene i BxPC-3-celler, hadde  $10^{-4}$  M PGE2 en additiv effekt sammen med LPA.

## 7 REFERANSER

1. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 377-386.
2. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2010. **39**(4): p. 425.
3. Kreftregistret. *Kreft statistikk*. 08.2012]; Available from: [www.kreftregistret.no](http://www.kreftregistret.no).
4. Soreide, K., H. Immervoll, and A. Molven, *Forstadier til kreft i bukspyttkjertelen*. TIDSSKRIFT-NORSKE LAEGEFORENING, 2006. **126**(7): p. 905.
5. Friedl, P. and K. Wolf, *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. The Journal of cell biology, 2010. **188**(1): p. 11-19.
6. Guan, J.-L., *Cell migration : developmental methods and protocols*2005, Totowa, N.J.: Humana Press. xv, 364 s., ill., some col.
7. Hulkower, K.I. and R.L. Herber, *Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery*. Pharmaceutics, 2011. **3**(1): p. 107-124.
8. Dorsam, R.T. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(2): p. 79-94.
9. Ben-Baruch, A., *Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors*. Clinical and Experimental Metastasis, 2008. **25**(4): p. 345-356.
10. Lappano, R. and M. Maggiolini, *G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 2011. **10**(1): p. 47-60.
11. Rozengurt, E., *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. Journal of cellular physiology, 2007. **213**(3): p. 589-602.
12. Cotton, M. and A. Claing, *G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration*. Cellular signalling, 2009. **21**(7): p. 1045-1053.
13. Rang, H.P., *Rang and Dale's pharmacology*2012, Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone. XXII, 777 s.
14. Hart, A.R., H. Kennedy, and I. Harvey, *Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2008. **6**(3): p. 275-282.
15. Anderson, K.E., et al., *Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**(15): p. 1168.
16. Tseng, W.W., et al., *Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer*. Journal of gastrointestinal surgery, 2002. **6**(6): p. 838-844.
17. Stan, S.D., S.V. Singh, and R.E. Brand, *Chemoprevention strategies for pancreatic cancer*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2010. **7**(6): p. 347-356.
18. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials*. The Lancet, 2011. **377**(9759): p. 31-41.
19. Choi, J.W., et al., *LPA receptors: subtypes and biological actions*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2010. **50**: p. 157-186.
20. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(7): p. 540-550.
21. Domanska, U.M., et al., *A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide*. European Journal of Cancer, 2012.
22. Singh, A.K., et al., *Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2012.

23. Kayali, A.G., et al., *The stromal cell–derived factor-1 $\alpha$ /CXCR4 ligand–receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas*. The Journal of cell biology, 2003. **163**(4): p. 859-869.
24. Billadeau, D.D., et al., *Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells*. International journal of gastrointestinal cancer, 2006. **37**(4): p. 110-119.
25. Nishizuka, Y., *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion*. 1984.
26. Nishizuka, Y., *The family of protein kinase C for signal transduction*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1989. **262**(13): p. 1826-1833.
27. Farago, A. and Y. Nishizuka, *Protein kinase C in transmembrane signalling*. FEBS letters, 1990. **268**(2): p. 350-354.
28. Roffey, J., et al., *Protein kinase C intervention—the state of play*. Current opinion in cell biology, 2009. **21**(2): p. 268-279.
29. Leirdal, M. and M. Sioud, *TyrosinkinaseresepTORras-ERK-signalveien som terapeutisk mal ved kreft*. TIDSSKRIFT-NORSKE LAEGEFORENING, 2002. **122**(2): p. 178-182.
30. Porter, A.C. and R.R. Vaillancourt, *Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1343.
31. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Experimental cell research, 2003. **284**(1): p. 99-110.
32. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-1293.
33. Gherardi, E., et al., *Targeting MET in cancer: rationale and progress*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**(2): p. 89-103.
34. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261.
35. Xu, D., et al., *Cancer cell-derived IL-1 $\alpha$  promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells*. Journal of Surgical Oncology, 2010. **102**(5): p. 469-477.
36. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 2004. **59**(2): p. S21-S26.
37. Baker, C.H., C.C. Solorzano, and I.J. Fidler, *Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer*. Cancer research, 2002. **62**(7): p. 1996.
38. Hynes, N.E. and G. MacDonald, *ErbB receptors and signaling pathways in cancer*. Current opinion in cell biology, 2009. **21**(2): p. 177-184.
39. Troiani, T., et al., *Targeting EGFR in Pancreatic Cancer Treatment*. Current Drug Targets, 2012. **13**(6): p. 802-810.
40. Liebmann, C., *EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different versions*. Molecular and cellular endocrinology, 2011. **331**(2): p. 222-231.
41. Buchanan, F.G. and R.N. DuBois, *Emerging roles of  $\beta$ -arrestins*. Cell Cycle, 2006. **5**(18): p. 2060-2063.
42. Ketterer, K., et al., *Neuromedin U is overexpressed in pancreatic cancer and increases invasiveness via the hepatocyte growth factor c-Met pathway*. Cancer letters, 2009. **277**(1): p. 72-81.
43. Di Renzo, M., et al., *Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer*. Cancer research, 1995. **55**(5): p. 1129-1138.

44. Maehara, N., et al., *NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells*. British journal of cancer, 2001. **84**(6): p. 864.
45. Matsushita, A., T. Götze, and M. Korc, *Hepatocyte Growth Factor–Mediated Cell Invasion in Pancreatic Cancer Cells Is Dependent on Neuropilin-1*. Cancer research, 2007. **67**(21): p. 10309-10316.
46. Qian, L.W., et al., *Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production*. Cancer letters, 2003. **190**(1): p. 105-112.
47. Sheng, H., et al., *Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells*. Journal of biological Chemistry, 2001. **276**(21): p. 18075-18081.
48. Buchanan, F.G., et al., *Role of  $\beta$ -arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(5): p. 1492-1497.
49. Kim, J.I., et al., *Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4- $\beta$ Arrestin1-c-Src signalsome*. Molecular Cancer Research, 2010. **8**(4): p. 569.
50. Wu, J., et al., *Prostaglandin E2 Regulates Renal Cell Carcinoma Invasion through the EP4 Receptor-Rap GTPase Signal Transduction Pathway*. Journal of biological Chemistry, 2011. **286**(39): p. 33954-33962.
51. Ito, H., et al., *Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2*. Cancer research, 2004. **64**(20): p. 7439.
52. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Critical reviews in oncology/hematology, 1995. **19**(3): p. 183.
53. Wilson, K.J., et al., *Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer*. Pharmacology & therapeutics, 2009. **122**(1): p. 1-8.
54. Iovanna, J., et al., *Current knowledge on pancreatic cancer*. Frontiers in Oncology, 2012. **2**.
55. Furukawa, T., *Molecular targeting therapy for pancreatic cancer: current knowledge and perspectives from bench to bedside*. Journal of gastroenterology, 2008. **43**(12): p. 905-911.
56. Lee, J., et al., *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma*. Cancer, 2007. **109**(8): p. 1561-1569.
57. Tzeng, C.W.D., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is highly conserved in pancreatic cancer*. Surgery, 2007. **141**(4): p. 464-469.
58. Mimori, K., et al., *Epidermal growth factor receptor gene is highly conserved in pancreatic cancer cells*. Pancreas, 2005. **31**(3): p. 299.
59. Zhang, Y., et al., *Antitumor activity of epidermal growth factor receptor–related protein is mediated by inactivation of ErbB receptors and nuclear factor- $\kappa$ B in pancreatic cancer*. Cancer research, 2006. **66**(2): p. 1025-1032.
60. Qian, L.W., et al., *Radiation stimulates HGF receptor/c-Met expression that leads to amplifying cellular response to HGF stimulation via upregulated receptor tyrosine phosphorylation and MAP kinase activity in pancreatic cancer cells*. International Journal of Cancer, 2003. **104**(5): p. 542-549.
61. Koshiba, T., et al., *Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression*. Clinical cancer research, 2000. **6**(9): p. 3530-3535.

62. Sung, B., et al., *Zerumbone down-regulates chemokine receptor CXCR4 expression leading to inhibition of CXCL12-induced invasion of breast and pancreatic tumor cells*. Cancer research, 2008. **68**(21): p. 8938-8944.
63. Marchesi, F., et al., *Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4*. Cancer research, 2004. **64**(22): p. 8420.
64. Mori, T., et al., *CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer*. Molecular cancer therapeutics, 2004. **3**(1): p. 29.
65. Heinrich, E.L., et al., *Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells*. Journal of Translational Medicine, 2012. **10**(1): p. 68.
66. Matsuo, Y., et al., *CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer*. International Journal of Cancer, 2009. **124**(4): p. 853-861.
67. Stähle, M., et al., *Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK*. Journal of cell science, 2003. **116**(18): p. 3835-3846.
68. Komachi, M., et al., *LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites*. Carcinogenesis, 2009. **30**(3): p. 457.
69. Yamada, T., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1*. Journal of biological Chemistry, 2004. **279**(8): p. 6595-6605.
70. Saunders, L.P., et al., *Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion*. Molecular cancer therapeutics, 2008. **7**(10): p. 3352-3362.
71. Wang, D. and R.N. DuBois, *Prostaglandins and cancer*. Gut, 2006. **55**(1): p. 115-122.
72. Cha, Y.I. and R.N. DuBois, *NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2*. Annu. Rev. Med., 2007. **58**: p. 239-252.
73. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7908.
74. Ding, X.Z., W.G. Tong, and T.E. Adrian, *Cyclooxygenases and lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer*. Pancreatology, 2001. **1**(4): p. 291-299.
75. Ding, X.Z., R. Hennig, and T.E. Adrian, *Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer*. Mol Cancer, 2003. **2**(10).
76. Wei, D., et al., *Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity*. Cancer research, 2004. **64**(6): p. 2030.
77. Omura, N., et al., *Cyclooxygenase-deficient pancreatic cancer cells use exogenous sources of prostaglandins*. Molecular Cancer Research, 2010. **8**(6): p. 821.
78. Crowell, P.L., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in hamster and human pancreatic neoplasia*. Neoplasia (New York, NY), 2006. **8**(6): p. 437.
79. Sato, N., N. Maehara, and M. Goggins, *Gene expression profiling of tumor–stromal interactions between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts*. Cancer research, 2004. **64**(19): p. 6950.
80. Hasan, S., et al., *Expression analysis of the prostaglandin E2 production pathway in human pancreatic cancers*. Pancreas, 2008. **37**(2): p. 121.

81. Molina, M.A., et al., *Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines*. Cancer research, 1999. **59**(17): p. 4356.
82. Yip-Schneider, M.T., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas*. Carcinogenesis, 2000. **21**(2): p. 139-146.
83. Yang, L., et al., *Host and direct antitumor effects and profound reduction in tumor metastasis with selective EP4 receptor antagonism*. Cancer research, 2006. **66**(19): p. 9665-9672.
84. Dumaz, N. and R. Marais, *Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways*. FEBS Journal, 2005. **272**(14): p. 3491-3504.
85. Kranenburg, O. and W.H. Moolenaar, *Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1540.
86. Mills, G.B. and W.H. Moolenaar, *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(8): p. 582-591.
87. Toullec, D., et al., *The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C*. Journal of biological Chemistry, 1991. **266**(24): p. 15771-15781.
88. Bian, D., et al., *The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration*. Oncogene, 2005. **25**(15): p. 2234-2244.